Ein Schnellnachweis für Hemmstoffe in Lebensmitteln tierischer Herkunft auf der Basis von TTC

Herbert Schulz

1962

Aus dem Institut für Nahrungsmittelkunde
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Professor Dr. L. Kotter

EIN SCHNELLNACHWEIS FÜR HEMMSTOFFE IN LEBENSMITTELN TIERISCHER HERKUNFT AUF DER BASIS VON TTC

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

von

Herbert Schulz

Tierarzt

aus

Schweinfurt

München 1962

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. K. Ullrich

Referent: Prof. Dr. L. Kotter

Tag der Promotion: 27. II. 1962

UNI-Druck, München 13, Amalienstraße 85

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	Einleitung	1
B.	Literatur	2
	I. Antibiotika	2
	1. Antibiotikakonzentrationen in tierischen Geweben nach therapeutischer, prophylaktischer und nutritiver Applikation	2
	a) Therapeutische und prophylaktische Anwendung	2
	b) Nutritive Anwendung	5
	2. Beeinflussung von bakteriologischen Untersuchungen durch antibiotikahaltiges Untersuchungsmaterial	6
	3. Antibiotika in der Lebensmittelkonservierung	7
	II. Konservierungsmittel bei Lebensmitteln tierischer Herkunft	10
	III. Desinfektionsmittel	14
	IV. Biologische Methoden zur Ermittlung von Hemmstoffen	15
	1. Allgemeines	15
	2. Mikrobiologische Grundlagen für Hemmstoffteste	20
	a) Testmikroben	20
	b) Nährmilieu	23
	c) Indikator	24
	d) Zeitpunkt der Ablesung	27

Seite

C. Eigene Untersuchungen 28

I. Vorversuche 28

1. Zur Auswahl der Testkeime 28

2. Zur Feststellung der optimalen Bebrütungstemperatur 28

3. Zur Ermittlung des optimalen Nährsubstrates 28

4. Zur Ermittlung von optimaler Einsaatmenge und Versuchsdauer 30

5. Zur Festlegung der optimalen Indikatorkonzentration 32

6. Ermittlung des optimalen Alters der Testkultur 36

II. Hauptversuche 40

1. Sensibilität des TTC-Testes bei Zusatz verschiedener Hemmstoffe zu Nährlösungen 40

2. Praktische Anwendung des TTC-Testes 50

a) Hemmstoffnachweis bei Fleisch, das mit Chlortetracyclin behandelt wurde 50

b) Hemmstoffnachweis in Fleisch und Organen eines vor der Schlachtung mit Penicillin behandelten Schweines 53

c) Hemmstoffnachweis in Organen von Schweinen, die Chlortetracyclin in nutritiv wirksamer Dosis erhalten haben 55

d) Hemmstoffnachweis in Muskulatur und Organen von Kälbern, denen Chlortetracyclin in nutritiv und therapeutisch wirksamen Mengen verabreicht worden war 56

D. Diskussion 59

E. Zusammenfassung 64

F. Literaturverzeichnis 65

Lebenslauf 83

A. EINLEITUNG

Mit der Einführung der Antibiotika in die Therapie von Infektionskrankheiten und die Lebensmittelkonservierung ergab sich für den Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln eine neue Situation, zumal mit den bis zur Antibiotika-Ära gebräuchlichen biologischen Hemmstofftesten nur rein chemische Konservierungsmittel zu erfassen waren. Die Anwendung spezifischer oder überwiegend chemischer Nachweisverfahren scheidet bei der Vielzahl der in Betracht kommenden Stoffe ohnehin aus. Besonderes Gewicht erhielt die Anwendung biologischer Hemmstoffteste auch durch den massiven und gelegentlich wohl auch planlosen Einsatz der Antibiotika in der Therapie von Nutztieren, wodurch Organe krank- oder notgeschlachteter Tiere häufig so hohe Antibiotikamengen enthalten, daß eine Isolierung eventuell vorhandener Keime in Frage gestellt ist. Es war daher auch zu prüfen, ob solche Organe ebenfalls durch ein Schnellverfahren erkannt werden können. Ferner war die Frage zu prüfen, ob nutritive und prophylaktische Dosen zu erfassen sind.

B. LITERATUR

I. Antibiotika

1. Antibiotikakonzentrationen in tierischen Geweben nach therapeutischer, prophylaktischer und nutritiver Applikation

Antibiotika können 1. nach therapeutischer Anwendung, 2. nach Verabreichung prophylaktischer Mengen, insbesondere in der Jungtieraufzucht, und 3. als nutritive, wachstumsaktive Mengen in den Tierkörper gelangen.

Für die Erörterung der im Rahmen dieser Arbeit anstehenden Probleme interessieren Verteilung, Verweildauer und Ausscheidung sowie erreichbare Blut- und Organkonzentrationen.

a) Therapeutische und prophylaktische Anwendung

Bei der therapeutischen Anwendung der Antibiotika sind ihr Verbleiben im Körper und die Höhe des therapeutisch wirksamen Blutspiegels von Applikationsart und -menge abhängig.

Penicillin wird in der Therapie peroral kaum angewendet, da es durch die Magensalzsäure rasch zerstört wird und die fünffache Menge der parenteralen Anwendung zur Erzielung des gleichen therapeutischen Effektes erforderlich wäre. Hingegen ist nach SCHERMER (121) bei der parenteralen Anwendung des Penicillin die Art der Injektion von untergeordneter Bedeutung, da sie ohne Einfluß auf Blutspiegel und therapeutischen Effekt ist. Die parenterale Anwendung einer wässerigen Penicillinlösung ergibt gute und rasche Verteilung in sämtlichen Geweben des Körpers, aber es erfolgt auch ebenso schnell Ausscheidung. Hierbei sind nur für 3 - 4 Stunden wirksame Blutspiegel erreichbar (32, 79, 121).

Als unterste Grenze der therapeutisch wirksamen Penicillin-Blutkonzentrationen werden im allgemeinen 0,03 E/ml angesehen (32, 46, 78, 121, 140). Nach Applikation schwer resorbierbarer Penicillinsalze, vor allem des Procain-Penicillins, werden länger anhaltende Blutspiegel erreicht, die je nach Dosierung für 24 - 36 Stunden therapeutisch wirksam sind (32, 46, 47, 78, 100, 121).

Nach KILLIAN (60) wird Penicillin zu etwa 80 % mit dem Urin ausgeschieden, zu 8 - 10 % inaktiviert im Serum. In Organen und Gewebsflüssigkeiten würden nur 40 - 50 % der verabreichten Dosis wiedergefunden; in welcher Form und wo die restlichen 50 - 60 % Penicillin im Körper vor der Ausscheidung durch die Nieren zu finden sind, sei bisher unbekannt.

Streptomycin muß beim Rind in einer Konzentration von 20 µg/ml Serum vorhanden sein, um therapeutisch wirken zu können. Bei Verwendung einer 33 %igen Lösung wird ein therapeutisch wirksamer Spiegel für 48 - 54 Stunden, bei Verwendung einer 50 %igen Lösung für 66 Stunden erreicht. Beim Pferd schwanken diese Zeiten bei Verwendung 33 %iger bzw. 50 %iger Lösung zwischen 22 und 28 Stunden (33).

Zur Aufklärung der Verteilung von Tetracyclinen im tierischen Organismus haben die Untersuchungen von DANOPOULOS und Mitarbeitern (16) beigetragen, die feststellten, daß oral aufgenommenes Aureomycin nach der Resorption durch die Magen- und Darmschleimhaut über den portalen Blutkreislauf in die Leber gelangt und von der Galle ausgeschieden wird. Aus dem Darminhalt werde es dann rückresorbiert und über die V. mesenterica und V. portae der Leber zugeführt. Es entstehe somit ein entero-hepatischer Kreislauf des Aureomycins, in dessen Verlauf kontinuierlich kleine Mengen über die hepatischen Venen an den großen Kreislauf abgegeben werden. Nach peroraler Applikation von 8,0 mg Aureomycin pro kg Körpergewicht ist beim Hund nach 3 Stunden die höchste Konzentration (1,2 - 1,5 p.p.m.) im Blut vorhanden, dann erfolgt langsame Abnahme, und nach 24 Stunden beträgt die Konzentration weniger als 0,3 p.p.m. In der Galle wurde eine zwei- bis dreimal höhere Aureomycin-Konzentration als im Blut gemessen, wobei die 24-stündige Ausscheidungskurve fast parallel zu derjenigen des Blutes lief.

Für Aureomycin und Terramycin wird ein Blutspiegel von 0,5 - 1,0 p.p.m. als unterste Grenze der therapeutischen Wirksamkeit angesehen (140). Nach intravenöser Injektion von 5 mg Aureomycin pro kg Körpergewicht wurden bei Pferd und Rind therapeutisch wirksame Spiegel für 24 Stunden, bei Verabreichung von 10 mg/kg Körpergewicht beim Pferd für 35 Stunden und beim Rind für 40 Stunden erzielt (31).

SCHIPPER und PETERSEN (122) verabreichten Aureomycin in Dosen von 200 - 400 mg an Kühe auf drei Arten: 1. intravenös, 2. Injektion durch die Haut in das Euter und 3. intramammär als Salbe. Die Verteilung des Antibiotikums in Blut, Harn und Milch wurde bis zur 72. Stunde gemessen, wobei nachfolgende charakteristische Unterschiede gefunden wurden:

Intravenös gespritztes Aureomycin wird hauptsächlich im Harn nach 36 Stunden ausgeschieden. In Milch und Blut läßt es sich in gleicher Konzentration etwa 24 Stunden lang nachweisen. Bei intramammärer Salbenverabreichung hält die Ausscheidung mit der Milch bis zu 72 Stunden an. Im Blut und Harn wird bei dieser Anwendungsform das Antibioticum nur bis zu 12 Stunden gefunden. Nach Injektion in die Milchdrüse erfolgt maximale Ausscheidung durch die Milch nach etwa 8 Stunden und erstreckt sich bis zur 48. Stunde, während im Blut und Harn nur unwesentliche Mengen bis zur 12. Stunde gefunden werden.

MAIER (82) stellte beim Schwein nach peroraler Verabreichung von 5 mg Aureomycin pro kg Körpergewicht in Kapseln 11,5 Stunden einen durchschnittlichen Maximalwert von 1,8 p.p.m. Serum, nach Verabreichung von 10 mg/kg Körpergewicht 15,5 Stunden einen durchschnittlichen Höchstwert von 3,1 p.p.m. Serum und nach Verabreichung von 20 mg/kg Körpergewicht 18,5 Stunden konstante Werte fest. Bei peroraler Verabreichung von Aurofac 20 in Dosen, die 5 mg Aureomycin pro kg Körpergewicht entsprechen, waren 17,5 Stunden, nach Verdoppelung der Aurofac-Menge auf einen Aureomycingehalt von 10 mg/kg Körpergewicht 18 Stunden und mit Aurofac-Mengen, die 20 mg/kg Körpergewicht entsprachen, 20 Stunden lang wirksame Blutkonzentrationen zu erzielen.

Für die Bildung therapeutisch wirksamer Dauerspiegel waren zweimal täglich 20 mg Aureomycin in Kapseln pro kg Körpergewicht oder einmal täglich 50 mg/kg Körpergewicht, jeweils eine Stunde vor der Fütterung verabreicht, erforderlich. Die täglich zweimalige Verabreichung von 0,45 g Aurofac 20 pro kg Körpergewicht (entspricht 20 mg Aureomycin pro kg Körpergewicht) ergab ebenfalls sehr ausgeglichene therapeutische Blutspiegel, so daß die drei letztgenannten Dosierungsarten für die Therapie empfohlen werden.

Mit Terramycin (30) konnten beim Rind nach intramuskulärer Injektion von 5 mg/kg Körpergewicht 20 Stunden und beim Pferd bei gleicher Dosierung 35 Stunden lang konstante Spiegel erreicht werden; nach Verabreichung der doppelten Menge betrug die Zeit beim Rind 48 Stunden und beim Pferd durchschnittlich 57,5 Stunden.

b) Nutritive Anwendung

Die in der Tierernährung als wachstumsaktive Substanzen verwendeten Antibiotica sind Tetracycline, Penicillin und Streptomycin (9, 41, 42, 55, 133, 142, 148), die überwiegend als Mycelrückstände aus der großtechnischen Antibioticagewinnung Futtermitteln beigemengt werden (55, 133, 148). Der Gehalt dieser Mycelrückstände an mikrobiell aktiven Antibiotika und die Aufnahme durch den tierischen Organismus werden durch die physikalischen und chemischen Eigenschaften des betreffenden Wirkstoffes bedingt. Penicillin wird z.B. durch die Lagerung inaktiviert und bei peroraler Anwendung zu 80 % durch die Magensäure zerstört (41, 55); Aureomycin wird an ein Vehikel (Sojamehl) gebunden, so daß Futtermittel auf einen garantierten Antibiotikagehalt eingestellt und standardisiert in den Handel gebracht werden können (133).

Nach WUSSOW und Mitarbeitern (148) ist im Streptomycinmycel die beträchtliche Menge an Vitamin B_{12} als wachstumsfördernder Faktor anzusehen, während beim vitamin-B_{12}-freien Penicillinmycel die Wirkung auf das Rohprotein zurückgeführt wird. Mikrobiologisch aktive Antibiotikareste konnten weder im Streptomycinmycel noch im Penicillinmycel ermittelt werden. Von KAEMMERER (55) durchgeführte Fütterungsversuche mit Mycel, das inaktiviertes Penicillin enthielt und Abbauprodukte von Penicillin G (Penillsäure, penicillinsaures Natrium) sowie den analogen Abbauprodukten des Penicillin V, die alle mikrobiell inaktiv sind, ergaben gegenüber den Kontrollen sichtlich verbesserte Gewichtszuwachsraten, womit gleichzeitig die Fütterungsaktivität von antibiotisch inaktivem Penicillin bewiesen wurde. Zu gleichen Feststellungen führten auch die Versuche von RUDOLPH (106).

In Deutschland hat sich in der Tierfütterung das Aureomycin wohl am meisten durchgesetzt (55, 133). Aureomycinhaltige Futterzusatzgemische sind als "Aurofac" mit einer Gehaltsgarantie von 4 g Aureomycin und 4 mg Vitamin B_{12} je Kilogramm und "Aurofac-2-A" mit einer Gehaltsgarantie von 8 g Aureomycin und ca. 2 mg Vitamin B_{12} je Kilogramm im Handel (133).

Folgende Aureomycinmengen werden durchschnittlich je Tier und Tag als nutritiv wirksam angegeben: Ferkel und Mastschweine 20 - 25 mg, Kälber 40 - 60 mg und Geflügel auf 1 kg Futter 10 - 15 mg Aureomycin (133).

Die in der Veterinärmedizin üblichen therapeutischen Antibiotikagaben sind 25- bis 100mal höher als die in der Fütterung gebräuchlichen (133). Somit reichen die als Beifütterung verabreichten Antibiotikamengen, die nur Bruchteile der therapeutischen Gaben betragen, zur Bekämpfung von akuten infek-

tiösen Krankheiten nicht aus. Sie greifen vielmehr fördernd und regulierend in das Stoffwechselgeschehen ein und sind als biologische Regulatoren zu bezeichnen, auch im Sinne der Normalisierung einer klinisch nicht in Erscheinung tretenden, durch unerwünschte Keime gestörten Darmflora (10, 41).

Unter Zugrundelegung der üblichen nutritiven Aureomycinmengen werden bei Schweinen und Kälbern bis zu 1 mg/kg Lebendgewicht verabreicht, die zur Ausbildung nachweisbarer Konzentrationen im Gewebe nicht ausreichen (9). Untersuchungen von LORENZ (80) ergaben, daß aktive Antibiotikareste weder in der Niere noch im Harn eines Schweines, das bis 24 Stunden vor der Schlachtung täglich mit 30 mg Aureomycin gefüttert wurde, nachweisbar waren.

2. Beeinflussung von bakteriologischen Untersuchungen durch antibiotikahaltiges Untersuchungsmaterial

Bereits 1953 wies HERTER (40) auf Schwierigkeiten bei der bakteriologischen Rotlaufdiagnose hin, wenn kranke Schweine vor der Schlachtung mit Penicillin behandelt worden sind. Krankheitserreger waren kulturell auch dann nicht nachzuweisen, wenn klinisch einwandfrei Rotlauf festgestellt worden war. CLARENBURG und KAMPELMACHER (12) konnten an den Organen eines notgeschlachteten Rindes, das wegen Milzbrandverdachtes mehrere Tage mit therapeutischen Dosen von Procainpenicillin und Dihydrostreptomycin behandelt wurde, die Milzbranderreger erst nach mehrmaligem Umzüchten kulturell nachweisen. Auch mikroskopisch konnten diese Krankheitserreger unmittelbar nach der Schlachtung weder im obligaten Blutausstrich noch in den gefärbten Ausstrichpräparaten der Milzpulpa nachgewiesen werden. Diese Feststellungen konnten durch anschließende Tierversuche bestätigt werden. Ferner konnten die Autoren bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung von 22 Kälbern, die regelmäßig ein Aureomycinpräparat im Futter erhalten hatten, feststellen, daß in den Organ- und Muskelproben vorhandene Salmonellen (S. dublin) nicht in der üblichen 18stündigen Bebrütungszeit bei 37 ^{o} C auf den Nährböden anwuchsen, was auf eine nachteilige Beeinflussung dieser Salmonellen - im Sinne einer Bakteriostase - infolge der laufenden Aureomycingaben zurückgeführt wurde.

Offenbar wird der Nachweis pathogener Keime nur durch therapeutische und nicht durch nutritive Antibiotikamengen beeinflußt (26, 40, 132).

Nach Versuchen an mit S. typhi-murium infizierten weißen Mäuse, denen einfache und dreifache nutritive sowie therapeutische Dosen von Aureomycin verabreicht worden waren, kommen KALICH und MERKENSCHLAGER (56) zu dem Schluß, daß die durch Aureomycinbeifütterung entstehenden Antibiotikagewebespiegel keine Beeinflussung der bakteriologischen Fleischuntersuchung zu erwarten ist. Dagegen konnten die Salmonellen aus den Tierkörpern, die therapeutische Aureomycindosen erhalten hatten, nur nach längerer Bebrütung und in geringerer Menge isoliert werden.

Auch die Berichte anderer Autoren (27, 83, 98, 114) sprechen dafür, daß Salmonellakeime auf Grund ihrer weitgehenden Resistenz gegenüber den gebräuchlichen Antibiotika durch therapeutische Konzentrationen nicht abgetötet, sondern nur so nachhaltig beeinflußt werden, daß sie nach der üblichen 18stündigen Bebrütungsdauer auf den obligaten Nährböden noch nicht zu isolieren sind.

3. Antibiotika in der Lebensmittelkonservierung

Nachdem die Antibiotika in der Bekämpfung pathogener Keime erfolgreich waren, lag es nahe, sie auch zur Unterdrückung von Fäulniserregern bei Lebensmitteln anzuwenden.

TARR (129) veröffentlichte 1944 die erste Arbeit über die Anwendung von Antibiotika für die Frischhaltung von Fischen. Seit dieser Zeit wurde die Haltbarkeitsverlängerung von Fisch, Geflügel, Fleisch und pflanzlichen Nahrungsmitteln durch Antibiotika weitgehend geprüft (17, 143, 146). Im Gegensatz zur Therapie sind jedoch die Anwendungsmöglichkeiten der verschiedenen Antibiotika in der Lebensmittelkonservierung sehr eingeengt.

LERKE und Mitarbeiter (76) testeten 19 verschiedene Antibiotika an Fischfilets auf qualitätserhaltende Eigenschaften. Von den geprüften Antibiotika bewirkten nur 3 Tetracycline auf Grund ihrer bakteriostatischen Wirkung eine erhebliche Verlängerung der Lagerungszeit von Fischen. Von diesen 3 Tetracyclinen erwies sich Chlortetracyclin (Aureomycin) als das aktivste. Mit einer 5 p.p.m. Aureomycin enthaltenden Tauchlösung und einer Tauchdauer von 5 Minuten wurde eine eineinhalbfach verlängerte Lagerzeit gegenüber unbehandelten Kontrollproben festgestellt (65, 76, 128). LERKE und Mitarbeiter (76) konnten im Preßsaft von Fischfilets, die 5 Minuten in einer 5 p.p.m. Aureomycin enthaltenden 5 %igen Salzlösung getaucht worden waren, 0,02 - 0,06 p.p.m. ermitteln, was einer Kon-

zentration von 0,3 - 0,9 p.p.m. Filet entspricht. KLINE und Mitarbeiter (65) untersuchten Fischfilets, die mit 5 bzw. 25 p.p.m. Aureomycinlösung behandelt wurden und stellten nach 14 Tagen fest, daß in der Haut höhere Aureomycinrückstände als im Fleisch zurückblieben. Der gefundene Höchstwert von 0,16 p.p.m. in der Haut wurde durch Kochen und Braten in der Pfanne vollständig zerstört, durch Braten auf dem Roste nur bis auf 0,03 p.p.m. reduziert.

Zur Verlängerung der Haltbarkeit geschlachteten Geflügels hat sich Chlortetracyclin (Aureomycin) ebenfalls als hervorragend geeignet erwiesen (1, 48, 49, 68, 144, 146). Für eine erfolgreiche Aureomycinbehandlung ist die einwandfreie Beschaffenheit der Hühner unbedingte Voraussetzung, d.h. die Schlachtung und die weitere Behandlung des Geflügels müssen unter hygienisch einwandfreien Bedingungen erfolgen, um den Anfangskeimgehalt der Hautoberfläche möglichst klein zu halten (49). KOHLER und Mitarbeiter (68) stellten fest, daß die nicht behandelten Kontrollhühner nach 14tägiger kühler Lagerung infolge starker Keimentwicklung verdarben, während die in einer 10 p.p.m. starken Aureomycinlösung 2 und 24 Stunden lang getauchten und unter gleichen Bedingungen gelagerten Hühner nur 1 % des Oberflächenkeimgehaltes der Kontrollhühner aufwiesen und keinen Qualitätsabfall zeigten. Die 2stündige Tauchzeit ergab gegenüber der 24stündigen hinsichtlich des Oberflächenkeimgehalts keinen wesentlichen Unterschied.

Auch ABBEY und Mitarbeiter (1) kamen zum Ergebnis, daß die Gewebskonzentrationen von getauchtem Geflügel durch die Chlortetracyclinkonzentration der angewandten Lösung beeinflußt werden und mit der Kühlwasseraufnahme im Zusammenhang stehen. Das Eindringen von Chlortetracyclin in das Gewebe ist auch von der Temperatur des zum Abbrühen verwendeten Wassers abhängig. So zeigten die bei 60 ^{o} C gebrühten Hühner im Vergleich zu den bei 52 ^{o} C behandelten einen höheren Gehalt an Chlortetracyclin, auch in tieferen Gewebsschichten. Tiefer gelegene Gewebe von ungekochten Hühnern neigen dazu, geringe Mengen von Chlortetracyclin (bis zu 1 p.p.m.) zurückzuhalten, was auch bei den Untersuchungen von WINDLAN und Mitarbeitern (144) an Truthühnern zu beobachten war. Durch 3 - 5 p.p.m. Aureomycin wird die Frischhaltung von Brühwurst um 50 - 100 % verlängert (146), während der Zusatz von 50 p.p.m. zu Dosenwürstchenlake die Haltbarkeit um das Doppelte verlängert (35). Durch Tauchen in oder Besprühen mit hochgradig verdünnten Antibiotikalösungen (10 p.p.m.) können Fleischstücke vom Rind und Schwein sehr viel länger frisch gehalten werden (80, 143, 146). Ganze Tierkörper oder Tierkörperviertel werden

durch Infusion einer 2 - 5 %igen Aureomycinlösung in das Blutgefäßsystem länger haltbar als unbehandelte (17, 50, 146).

WEISER und Mitarbeiter (141) haben ein Verfahren zur Infusion von Antibiotika während der Schlachtung ausgearbeitet. In physiologischer Kochsalzlösung gelöstes Aureomycin wird unmittelbar nach der Betäubung des Tieres mittels einer Pumpe durch eine Kanüle in die große Halsschlagader injiziert, während das Blut durch die Jugularvene abläuft. Die auf diese Weise infundierte Aureomycinlösung beträgt insgesamt 10 % des Gesamtlebendgewichtes des Tieres und ergibt eine Endkonzentration im Fleisch von etwa 2 p.p.m. Nach 4tägiger Lagerung bei 1 °C war das Antibiotikum nicht mehr nachzuweisen.

SACCHI und Mitarbeiter (109) haben neue Infusionsmethoden vor der Schlachtung mit Oxytetracyclin an Rindern, Kälbern und Schafen erprobt, und zwar für Schafe entweder am Ohrgrund oder intraperitoneal, für Rinder intraperitoneal oder in den distalen Teil des Schwanzes. Hierbei stellten sie fest, daß die Oxytetracyclinspiegel eine zwei- bis dreifache Verweildauer erhielten, wenn zugleich Ascorbinsäure gegeben wurde. Untersuchungen der Lendenmuskulatur der so behandelten Tiere ergaben bei kühler Lagerung nach 6 Wochen noch einen Oxytetracyclingehalt von 15 p.p.m. Ebenso führten Versuche mit Lösungen, die drei Teile Zitronensäure und 1 Teil Oxytetracyclin enthielten, zu lang anhaltenden Gewebsspiegeln in Fleisch und Organen.

HENNEBERG (39) und KISSLING (61) hatten in Versuchen zur Haltbarkeitsverlängerung von Fleisch mit Tetracyclin die günstigsten Ergebnisse bei einer Konzentration von 30 p.p.m. und einer Tauchzeit von einer Stunde. Gleichzeitig wurde die Verwendung antimykotischer Substanzen geprüft und ein Zusatz von 0,16 % Sorbinsäure empfohlen.

JAY, WEISER und DEATHERAGE (50, 51) untersuchten den Einfluß der Tetracycline auf fleischhygienisch bedeutungsvolle Keime. Sie stellten fest, daß die Sensibilität der Keime in vitro mit der im Fleisch nicht übereinstimme. Während besonders widerstandsfähige Keime, wie z.B. Proteus und Mikrokokken, bei in vitro-Testungen erst bei 50 und 100 p.p.m. Aureomycin gehemmt wurden, genügte im Fleisch ein Zehntel dieser Konzentration.

Die Tatsache, daß geringste Mengen von Chlortetracyclin Keime im Fleisch hemmen, die sich in vitro gegen dieses Antibiotikum als widerstandsfähig

erwiesen, wird darauf zurückgeführt, daß die Tetracycline die Fähigkeit besitzen, das Ionengleichgewicht im Fleisch zu stören, womit auch die Überlegenheit dieser Wirkstoffe gegenüber den meisten anderen Antibiotika bei der Haltbarkeitsverlängerung von Fleisch zu erklären ist (51).

Es wird angenommen, daß Tetracycline mit zweiwertigen Ionen des Fleisches Chelatbindungen eingehen und diese für die Bakterien lebenswichtigen Stoffe damit blockiert sind (50, 51).

II. Konservierungsmittel bei Lebensmitteln tierischer Herkunft

Mit der Anwendung der Antibiotika in der Lebensmittelkonservierung haben neuerdings auch einige Konservierungsmittel in Kombination mit ersteren Bedeutung erhalten. So stellte BRANDES (7) fest, daß Hefen und Schimmelpilze (Mucor-, Cladosporium, Aspergillus- und Penicilliumarten) im Wachstum auf 10 p.p.m. Aureomycin enthaltendem Fleisch gefördert wurden und gegenüber den aureomycinfreien Kontrollproben gutes Wachstum zeigten. Diese auch bei anderen Lebensmitteln gemachte Beobachtung gab Veranlassung, Antibiotika in Verbindung mit Stoffen anzuwenden, die gegen Hefen und Schimmelpilze wirksam sind (39, 48, 49, 99, 109). So empfehlen z.B. NIVEN und CHESBRO (99) eine kombinierte Anwendung von Tetracyclinen mit 0,1 %iger Sorbinsäure und Gammabestrahlung (100 000 rep) als wirksame konservierende Behandlung gegen den mikrobiellen Verderb frischer, vorverpackter Fleischwaren.

Viele Konservierungsmittel, insbesondere organische Säuren oder deren Verbindungen, haben ihr Wirkungsoptimum im sauren Bereich (73, 120). Dafür ist der undissoziierte Anteil der Säure maßgebend. Während im sauren Milieu vor allem Benzoe- und Sorbinsäure sowie Hexamethylentetramin wirksam sind, wirkt Borsäure im neutralen Milieu. Die Verwendung der beiden letzteren ist jedoch wegen gesundheitlicher Bedenken beschränkt und wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) abgelehnt.

Sorbinsäure, Hexadien-2,4-säure-1 (CH_3-CH=CH-CH=CH-COOCH)- die Bezeichnung wird von ihrem Vorkommen in den Früchten der Eberesche (Sorbus aucuparia L.) abgeleitet - ist hitze- und lichtempfindlich, in Wasser wenig löslich (bei 20 °C zu 0,16 %; bei 50 °C zu 0,6 %), leicht löslich in Alkohol und Äther; in Fetten und fetten Ölen ist die Löslichkeit 3- bis 5mal größer als in Wasser (4, 104). Die Sorbinsäure wirkt

in erster Linie gegenüber Schimmelpilzen und Hefen, in höheren Konzentrationen auch gegen Bakterien (4, 14, 39, 104, 112, 119). Wegen ihrer geringen Dissoziationskonstante ($K = 1,73 \cdot 10^{-5}$) wirkt sie bei pH-Werten über 5,5 besser als Benzoesäure (4, 73, 119). Die antimikrobielle Wirksamkeit der Sorbinsäure beruht auf der Hemmung des Dehydrogenase-Enzymsystems der Mikroorganismen (112).

LERCHE und LINKE (75) stellten in Versuchen zur Abtötung von Salmonellen (S. typhi murium, S. dublin) in flüssigem Eigelb fest, daß die Wirkung der Sorbinsäure weitgehend vom p_H-Wert ($< 5,3$) und von der während der Einwirkungszeit herrschenden Temperatur abhängig ist. In 0,01 %iger Konzentration hat Sorbinsäure Salmonellen gehemmt, Abtötung erfolgte erst bei 0,1 % und 52 °C nach 4 Stunden.

Über eine Anwendung zur Konservierung von frischem Fleisch ist noch wenig bekannt. Hier wurde sie nur in Kombination mit Tetracyclinen zur Unterdrückung des Oberflächenwachstums von Hefen und Schimmelpilzen erprobt und empfohlen (39, 48, 53, 99). Nach § 4 a LMG darf Sorbinsäure bei Fleischwaren nicht unmittelbar verwendet werden, jedoch dürfen nach Konservierungsstoff-VO der Mayonnaisenanteil von Fleischsalaten, Aspik, eßbare gelatinhaltige Überzugsmassen für Fleischwaren sowie Gewürz- und Salatsoßen Sorbinsäure in bestimmten Mengen enthalten. Die Vorzüge der Sorbinsäure liegen vor allem in der ernährungsphysiologischen Unbedenklichkeit (4, 73, 87, 113, 119). Da die Sorbinsäure bei dem höheren tierischen Organismus wie eine reguläre niedere Fettsäure umgesetzt wird, liefert sie im intakten Organismus im gleichen Umfange CO_2 bzw. Acetessigsäure, wie die Capron- oder Octansäure, und wird wie diese als Energiequelle benützt (73).

Benzoesäure (C_6H_5COOH) kommt als Ester und als freie Säure in vielen Harzen vor (104). In kaltem Wasser ist sie schwer löslich (1 : 270); dagegen ist sie leicht löslich in siedendem Wasser, Alkohol und Äther (104). Als Konservierungsmittel wird sie bei Margarine, Obst und Gemüseerzeugnissen (15, 112), vor allem aber bei fischindustriellen Erzeugnissen verwendet (5, 44, 97). GRAU und CORETTI (34) hatten Hydrin (17 % Benzoesäure + 4 % Natriumbenzoat + 79 % NaCl) zur Haltbarmachung von Dosenwürstchen empfohlen.

Benzoesäure und Natriumbenzoat wirken nur im sauren Medium; ein Absinken des p_H-Wertes von 7,0 auf 3,5 bedingt eine Verzehnfachung der bakteriziden Wirkung (118). Die bakterien- und schimmelhemmende Wirkung

des Natriumbenzoats ist nach SABALITSCHKA und MARX (108) auf die Benzoesäure zurückzuführen, die in hinreichend sauren Medien freigesetzt wird. Nur die undissoziierte Säure wirkt bakterizid (44, 97, 107, 108, 117, 118, 120). Die Wirkungsweise der Benzoesäure beruht auf ihrer Anreicherung in der Zellmembran der Mikroorganismen, wodurch Verminderung der Zellpermeabilitä: und im weiteren Verlauf auch Zerstörung der Zellhülle bedingt werden (15, 73, 149).

Wird die Benzoesäure oder ein Salz dieser verhältnismäßig schwachen Säure gelöst, so stellt sich in Abhängigkeit vom p_H-Wert des Lösungsmittels oder des Substrates ein Gleichgewicht zwischen den dissoziierten Ionen und der freien undissoziierten Säure ein, wodurch auch die Einwirkung der Benzoesäure auf das eiweißhaltige Konservierungsgut zurückzuführen ist (117, 118, 120). Im sauren Medium wird Benzoesäure schlagartig an das Fischfleisch bzw. Wurstbrät angelagert; das Verhältnis Fisch bzw. Fleisch zum Aufguß ist hinsichtlich der Aufnahme von Benzoesäure von großer Bedeutung (34, 44). Nach Untersuchungen von HUTSCHENREUTHER (44) waren bereits nach 24 Stunden 80 % und nach 48 Stunden 90 % der Benzoesäure vom Fisch aufgenommen worden. GRAU und CORETTI (34) stellten fest, daß Dosenwürstchen bereits 2 Stunden nach erfolgter Sterilisation rund 25 %, nach einem Tag schon über 40 % der in der Aufgußlake vorhandenen Benzoesäure aufgenommen hatten; nach einem Tag sei annäherndes "Diffusionsgleichgewicht" vorhanden. Als zulässige Höchstmenge werden je nach Art des Lebensmittels 50 bis 1000 mg/100 g Lebensmittel angegeben (113). Von der DFG wird die Benzoesäure zu den duldbaren Konservierungsmitteln gerechnet, da sie im menschlichen Organismus nicht gespeichert werde (73, 113). Ihre gesetzlich zulässige Verwendung auf dem Fleischsektor entspricht der der Sorbinsäure.

Hexamethylentetramin mit den Handelsbezeichnungen Hexa, Hexamin, Formin, Urotropin, Hexamethylenamin hat die Formel $(CH_2)_6N_4$. Die technische Darstellung erfolgt meist aus wässeriger Formaldehydlösung und Ammoniak. Die Reinsubstanz ist ein weißes, kristallines, hygroskopisches Pulver von anfangs süßem, später bitterem Geschmack und in 1,5 Teilen Wasser und 10 Teilen Alkohol löslich; leichtlöslich ist es in Chloroform, unlöslich in Äther (104). Hexamethylentetramin findet in Deutschland als Konservierungsmittel in großem Umfang bei fischindustriellen Erzeugnissen (Kaltmarinaden, Krebsschwänze, Kaviar und anderen Fischrogen) Verwendung (5, 44, 97, 112, 116, 124). Nach v. SCHELHORN (116) ist es spezifisch wirksam gegenüber Bakterien und Sporenbildnern, dagegen

weniger wirksam gegenüber Hefen und Schimmelpilzen. Seine antimikrobielle Wirkung beruht allein auf der hydrolytischen Abspaltung des stark antiseptischen Formaldehyds. Sie ist im sauren Milieu stärker als im neutralen, also von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig (5, 44, 97, 116, 124).

Nach Untersuchungen von SCHMIDT-LORENZ (124) kann Hexamethylentetramin in sauren Fischpräserven eine gewisse mikrobizide Depotwirkung haben, da das gebildete Formaldehyd an Eiweiß gebunden wird und entsprechend dem jeweiligen Säuregrad immer wieder Formaldehyd hydrolytisch abgespalten werden kann. Formaldehyd selbst hat infolge der Reaktion mit dem Mikroorganismeneiweiß bzw. einer Reaktion mit den aktiven Gruppen der Enzymproteine keimtötende Wirkung (15, 124, 149).

Hexamethylentetramin und auch Formaldehyd werden zu den langsam wirkenden Desinfektionsmitteln und Konservierungsmitteln gerechnet, da ihre Wirkung auf einer langsam ablaufenden Reaktion mit dem Fischfleisch bzw. dem Mikroorganismeneiweiß beruht (44, 116, 124).

Formaldehyd entsteht auch beim Räuchern von Fleisch- und Fischwaren. Im Gegensatz zu der in der Literatur allgemein vertretenen Auffassung, daß durch das Räuchern bis 100 mg % und mehr Formaldehyd in ein Lebensmittel gelangen kann (124), konnte das Institut für Fischverarbeitung in Hamburg (45) in Fisch- und Fleischwaren stets nur Spuren, in keinem Fall aber mehr als 2 mg % Formaldehyd nachweisen.

Durch Hexamethylentetramin oder Formaldehyd können Zellen zur Mutation angeregt werden (45, 81, 84, 112, 113, 124). Außerdem ist Formaldehyd auf Grund seiner eiweißhärtenden Wirkung geeignet, nachteilige Veränderungen eines Lebensmittels zu verdecken (45, 113, 124). Aus diesen Gründen wurde das Formaldehyd als Lebensmittelzusatzstoff von der DFG abgelehnt (112, 113). Hexamethylentetramin als Konservierungsmittel für die Fischindustrie wird daher durch ein anderes, geeigneteres Konservierungsmittel ersetzt werden müssen (87, 113, 124). In der Konservierungsstoff-VO wurde seine Anwendung für einige Fischpräserven weiterhin gestattet. Auf dem Fleischsektor darf es auf Grund von § 4a LMG nicht angewendet werden.

Borsäure (H_3BO_3) - in Reinsubstanz schuppige, weiße, glänzende Blättchen - ist in Wasser schwer löslich. Ein Liter Wasser löst bei 0 °C 19,5 g, bei 20 °C 40 g und 102 °C 291 g Borsäure. In Alkohol ist sie 1 : 25 und in Glyzerin 1 : 5 löslich. Beim Erhitzen auf etwa 70 °C geht Borsäure unter Wasserabspaltung in Metaborsäure (HBO_2) über (104).

Borsäure besitzt nur schwache absolute mikrobiologische Wirksamkeit. Auf Grund einer Dissoziationskonstanten von $7,3 \cdot 10^{-10}$, die weitaus niedriger als bei anderen Säuren ist, liegt Borsäure bei allen p_H-Werten $< 7,0$ über 99 % in undissoziiertem, mikrobiell wirksamem Zustand vor (115). Die mikrobielle Wirkung besteht in einer Reaktion mit den Enzymen des Phosphorstoffwechsels (15, 149). Borsäure ist ein Kumulationsgift (113); bei wiederholter Aufnahme wird sie in bestimmten Organen und Geweben des Körpers gespeichert und ruft bei Erreichung einer gewissen Konzentration Schädigungen, vor allem der Nieren, aber auch Verdauungsstörungen und starke Abmagerung hervor (20, 101, 104, 113).

Als Konservierungsmittel gegen mikrobiell bedingten Verderb wurde Borsäure bisher zur Konservierung von Anchovis, Appetitsild, Gabelbissen, Krabben, Kaviar und flüssigem Eigelb (44, 97, 112, 113) in einer zulässigen Höchstmenge von 500 - 1500 mg/100 g geduldet; sie wird jedoch von der Kommission der DFG als Konservierungsmittel abgelehnt (112, 113) und ist auf Grund von § 4a LMG nicht mehr zulässig; die Konservierungsstoff-VO sieht keine Ausnahmen vor.

III. Desinfektionsmittel

Desinfektionsmittel sind von einigen Ausnahmen abgesehen schon wegen starken Eigengeruchs oder -geschmacks meist nicht geeignet, Lebensmitteln als verderbnishemmende Stoffe zugesetzt zu werden. Aus toxikologischen Gründen ist aber auch die Verwendung geruchlich und geschmacklich inerter Desinfektionsmittel für einen solchen Zweck abzulehnen.

Es ist aber bekannt geworden, daß bei der Herstellung von Dosenfleischwaren Desinfektionsmittel z. T. "großzügig" verwendet wurden, so daß auch mit beachtlichen Desinfektionsmittelkonzentrationen in eingedosten Lebensmitteln zu rechnen ist.

Das ähnlich gelagerte Problem, das sich aus der Desinfektion der Milchgefäße ergibt, wurde von KOTTER, TERPLAN und PFEIFFER (71) untersucht. Die Autoren konnten zeigen, daß durch die Desinfektion von Gebrauchsgegenständen, selbst wenn eine Nachspülung unterbleibt, keine Mengen zurückbleiben, welche die Haltbarkeit der Milch beeinflussen können. Für Desinfektionsmittelmengen, die biologisch nachzuweisen sind, kommen praktisch nur grob fahrlässige Gerätedesinfektion oder Zusatz in Frage. Man wird diese Ergebnisse bis zu einem gewissen Grad auch auf die eingedosten Lebensmittel übertragen können.

IV. Biologische Methoden zur Ermittlung von Hemmstoffen

1. Allgemeines

Der spezifische chemische Nachweis von Hemmstoffen ist ohne bestimmte Verdachtsmomente zeitraubend und schwierig. Im Falle eines negativen Ergebnisses kann auch nur gesagt werden, daß Konservierungsmittel, nämlich die, auf die untersucht wurde, nicht nachzuweisen waren. Einer Aussage, wonach keine Konservierungsmittel vorhanden seien, steht die große Zahl der Hemmstoffe und deren unterschiedlicher chemischer Aufbau entgegen. - Für systematische Routineuntersuchungen ist der spezifische Nachweis also nicht geeignet. Bemühungen um einen unspezifischen biologischen Test lagen deshalb schon immer nahe.

Das Prinzip des biologischen Hemmstoffnachweises beruht darauf, daß man das fragliche Nahrungsmittel oder einen Auszug davon mit Testkeimen versetzt und diese dann in ihrer Entwicklung beobachtet, nachdem vorher notwendigenfalls noch Nährstoffe beigegeben worden sind.

Die Bemühungen um biologische Hemmstoffteste bekamen erst dann besondere Impulse, als immer mehr Frischerhaltungsmittel und direkt oder indirekt auch Chemotherapeutika in den Lebensmitteln erschienen waren. Ein wesentliches Moment war dabei auch die gefährdete mikrobiell-fermentative Weiterverarbeitung der Lebensmittel, wobei die Milch im Vordergrund stand, weil es insbesondere infolge von Antibiotikaresten nach Mastitisbehandlungen zu fehlerhaften Milchprodukten gekommen war.

LEBER (74) und MOLDAVAN (85) haben deshalb für den Nachweis von Hemmstoffen in Milch das reduktometrische Prinzip wieder aufgegriffen. Die Milch wird dabei mit der auch beim Reduktasetest gebräuchlichen Resazurinlösung und einem Säurewecker versetzt und dann bebrütet. Auf die Anwesenheit von Hemmstoffen wurde geschlossen, wenn das Resazurin in der Verdachtsprobe 30 min später als in der Kontrolle entfärbt war. Nach Untersuchungen anderer Autoren (25, 53) sollen niedrige Hemmstoffkonzentrationen mit dieser Methode jedoch nicht zu erfassen sein.

In der Praxis der Milchuntersuchung haben jedoch zuerst mehr diejenigen Teste Eingang gefunden, bei denen die Säurebildung registriert wird (24, 53, 69, 89). So hat FLEISCHMANN (24) unter Zugrundelegung des azidimetrischen Prinzips neben Str. thermophilus oder Thermobact. bulgaricum auch Joghurtkulturen, also ein Gemisch beider Kulturen, als Testkeime verwendet. Da sowohl bei Str. thermophilus als auch bei Joghurtkulturen

mit Penicillin schon ab 0,02 E/ml eine deutliche Hemmung der Säurebildung beobachtet werden konnte und Joghurtkulturen leichter weiterzuzüchten sind, schlägt FLEISCHMANN vor, daß man zur kurz aufgekochten Verdachtsprobe lediglich eine Joghutkultur gibt und dann nach 2stündiger Bebrütung titriert. Wenn zwischen der Verdachtsprobe und den Kontrollen ein Unterschied von 5 oder mehr Säuregraden auftritt, bestehe Verdacht auf Zusatz von Penicillin. Eine nicht durch Penicillin verursachte Hemmung der Säuerung sei ausgeschlossen, wenn einem weiteren Teil der Verdachtsprobe zur Aufspaltung des Penicillins Penase zugegeben werde; dieser Ansatz müsse dann mit dem der Kontrolle übereinstimmen.

Auch MOSSEL (89) verwendet für den zusätzlichen Antibiotikanachweis ein Säuretitrationsverfahren, wobei ihm Aerobacter aerogenes und Str. faecalis als Testkeime dienen. Im übrigen ist es das besondere Verdienst MOSSEL's und seiner Mitarbeiter (86, 87, 88, 89, 90, 91), daß er den Glukosevergärungstest nach KLUYVER (66) für die verschiedenen Lebensmittel modifizierte und den bisher vernachlässigten indirekten Hemmstoffnachweis der besonderen Beachtung empfahl. Nach MOSSEL (92) ist eine Konservenprüfung heute nicht mehr adäquat, wenn nicht ausgeschlossen wird, daß die beobachtete Stabilität einer Ware durch Zugabe von Konservierungsmitteln oder Antibiotika erreicht worden ist. Angesichts der erheblichen chemischen und biologischen Verschiedenheit der dafür in Frage kommenden Stoffe sei eine diesbezügliche Überwachung von Konserven nur durch die Anwendung von unspezifischen mikrobiologischen Methoden zu erreichen. - Für die Milch hatten MOSSEL und MANDERSLOOT (93) unter Beachtung der Tatsache, daß Laktose von Saccharomyces cerevisiae nicht angegriffen wird, zuerst eine Vergärung mit Aerobacter aerogenes vorgeschlagen. Da aber Bäckerhefe im Handel erhältlich sei und in Gegenwart antimikrobiell wirksamer Stoffe konstante Aktivität und Resistenz besitze, wurde dann auch für die Milch der Kluyver-Test empfohlen (91), zumal Sacch. cerevisiae gegenüber p_H-Schwankungen weniger labil sei und deshalb auch auf die Anwendung eines Puffers verzichtet werden könne. Die Indifferenz von Bäckerhefe gegenüber den Antibiotika wurde ebenfalls positiv vermerkt. Ein Nachteil sei diese Tatsache erst dann, wenn es zu einer verbreiteten Anwendung der Antibiotika käme (89). Beim Test nach Kluyver-Mossel werden zu pasteurisierter Milch Glukoselösung und eine Aufschwemmung von Bäckerhefe gegeben. Die mit Dextrose und Hefe versetzte Milch wird dann in zwei Einhorn-Gärröhrchen 48 Stunden bebrütet und anschließend das Volumen des gebildeten Gases mit dem der Kontrolle verglichen. Da MOSSEL beobachtet hatte, daß auch die Stabilität mancher nichtsteriler

Fleischkonserven in unzulässiger Weise mit kleinen Mengen an hochtoxischen antimikrobiellen Stoffen gesteigert wird, hat er (88, 89) auch für gepökelte Fleischwaren eine Methode vorgeschlagen, die bei Würsten, Fischprodukten usw. in gleicher Weise Anwendung finden kann. Ein Teil der zerkleinerten Probe wird dabei mit Weinsäure extrahiert und ein weiterer Teil mit Natronlauge. Auf diese Weise werden nicht nur Konservierungsmittel, wie Borsäure, sondern auch alkalisch lösliche, wie Bromessigsäurederivate, erfaßt. Beide Extrakte werden dann zuerst auf p_H 3 eingestellt, 1 min bei 80 ^{o} C pasteurisiert, mit Hefeextrakt und Dextroselösung versetzt und schließlich auf p_H 4 eingestellt. Daraufhin erfolgt die Beimpfung mit Bäckerhefe. In Einhorn-Gärröhrchen werden die Ansätze dann 24 - 30 Stunden bei 24 ^{o} C bebrütet, und anschließend wird das Gasvolumen verglichen.

CORETTI (13) hat diese Anregung in Deutschland aufgegriffen. Die nach dem Kluyver-Mosselschen Verfahren beimpften Extrakte gab CORETTI in fünf Gärungseprouvetten und kontrollierte dann nach 24stündiger Bebrütung in Abständen von 3 Stunden die CO_2-Entwicklung. Wenn in den Kontrollröhrchen, die mit konservierungsmittelfreiem Extrakt derselben Warenart beschickt waren, maximal Gas gebildet war, galt die Reaktion als beendet. Auf das Vorhandensein von Konservierungsmitteln wurde geschlossen, wenn in dem zu prüfenden Extrakt auch nach 48 Stunden noch keine Vergärung eingetreten war. Bei negativer oder nur 50 %iger Gasbildung nach 33 Stunden, aber vollständiger Vergärung nach 48 Stunden wurde Verdacht auf Konservierungsmittel notiert. Von ca. 100 nach diesem Verfahren untersuchten Dosenschinken, Dosenwürstchen und anderen zum Export bestimmten Dosenfleischwaren sei mit dieser Methode jedoch in keinem Fall ein sicherer Nachweis zu führen gewesen, obwohl in einzelnen Fällen der Konservierungsmittelzusatz bekannt war oder nachträglich chemisch bewiesen wurde. CORETTI zeigte, daß die mit der Gärmethode nachweisbaren Mindestmengen für die Konservierungsmittel ziemlich hoch liegen. Nachdem die in Fleischwaren bisher gefundenen Mengen an Konservierungsmitteln in der Regel unterhalb der Hemmdosis liegen, sei es notwendig, den biologischen Test weiter zu verbessern.

Nachdem bekannt geworden war (43, 54, 105), daß Antibiotikareste nach Mastitisbehandlungen besonders die Methylenblaureduktaseprobe aber auch den Resazurintest so beeinflussen, daß die Milch eine günstigere Beurteilung erfährt als ihr in Wirklichkeit zukäme, sind in der Literatur Hinweise auf neue Bestrebungen zu finden, doch über eine Reduktionsprüfung weiterzukommen.

So bauten EISENBRAND, KLAUCK und PFEIL (21) auf der Tatsache auf, daß Azofarbstoffe durch Milchsäurebakterien reduziert werden. Gegenüber Farbstoffen, wie Methylenblau, die wegen ihres definierten Redoxpotentials für solche Untersuchungen besonders nahe liegen, hätten die Azofarbstoffe den Vorteil, daß sie irreversibel reduziert werden, wodurch der Einfluß der Luft ausgeschaltet werde. Die gekochte Milch wird bei dieser Methode mit frischer Buttermilch und einer Lösung von Azorubin oder Brillantschwarz versetzt. Azorubin gibt einen hellroten Ansatz, Brillantschwarz einen hellblauen. Die Proben seien meist schon nach 3stündiger Bebrütung abzulesen. Bei ungehemmter Tätigkeit der Bakterien, die an einer Blindprobe zu beobachten sei, müsse die Färbung verschwinden.

Andererseits haben NEAL und CALBERT (95, 96) ein Verfahren zum Nachweis von Antibiotika für die Milch entwickelt, das folgendermaßen durchgeführt wird: 10 ml Milch werden zur Inaktivierung der milcheigenen Inhibine und zur Abtötung der stets vorhandenen reduzierten, eventuell auch antagonistisch wirkenden Keime sowie zur Ausschaltung eventuell vorhandener Bakteriophagen (15, 30) auf 80 ^{o} C erhitzt, nach dem Abkühlen mit 1 ml einer 1 : 1 verdünnten Str. thermophilus-Kultur beschickt und dann zwei Stunden bebrütet. Nach Zugabe von 0,3 ml einer 4 %igen TTC-Lösung wird dann nochmals 30 min bebrütet. Bei starker Hemmung bleibt die Milch weiß. Eine Hemmung sei jedoch auch dann zu notieren, wenn die Verdachtsprobe trotz schwacher Rotfärbung infolge geringer Formazanbildung deutlich heller bleibe als die garantiert hemmstoffreie Probe.

KOTTER und MUSPACH (70) sowie DRAGON (19) haben den von NEAL und CALBERT empfohlenen Test mit Joghurtkulturen durchgeführt; erstgenannte Autoren haben ihn auch für die Untersuchung von Trockenmilch- und Milcheiweißpräparaten empfohlen. Auch für die bakteriologische Fleischuntersuchung haben sich mit der Antibiotikaanwendung, wie vorher schon angedeutet wurde, neue Probleme dadurch ergeben, daß die Diagnostik beeinträchtigt ist, wenn die Tiere vor der Schlachtung mit therapeutischen Antibiotikamengen behandelt worden sind. Milzbrandbazillen, Rotlauferreger und Salmonellen wachsen bei entsprechenden Antibiotikakonzentrationen wesentlich langsamer und sind dann auf den üblichen Nährböden nach 18 Stunden noch nicht wahrzunehmen. Um dieser Unsicherheit bei der bakteriellen Fleischuntersuchung zu begegnen, halten es CLARENBURG und KAMPELMACHER (12) für notwendig, bei der bakteriellen Fleischuntersuchung gleichzeitig eine Antibiotikabestimmung durchzuführen und die Nährböden dann 48 Stunden zu bebrüten. KALICH und MERKENSCHLAGER (56) sehen

eine Konsequenz darin, daß man die Beimpfungstechnik in der Form ändert, daß größere Mengen an Nährmedien als Verdünnungsmittel verwendet und dem Nährboden auch noch Stoffe zugesetzt werden, welche die etwa vorhandenen Antibiotika inaktivieren.

Nach Fertigstellung dieser Arbeit erschienen mehrere Veröffentlichungen über dieses Problem. So haben insbesondere in Arbeiten dieses Instituts KOTTER und Mitarbeiter (69a, 69b, 71a) die Einführung eines unspezifischeren Hemmstofftestes bei der bakteriologischen Untersuchung empfohlen und dafür eine Methode vorgeschlagen, deren Grundlagen z. T. im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden. Als Testkeime dienen Staphylokokken, und als Wachstumsindikator TTC. Nachdem der Test durch die Eigenfarbe des Substrates u. U. beeinträchtigt werden kann, hatte TERPLAN (129a) vorgeschlagen, das Wachstum der Testkeime anhand deren Katalaseaktivität, und zwar volumetrisch, zu beobachten.

Unter Berücksichtigung der in der Tiermedizin üblichen Antibiotika hatte KELCH (58) zunächst empfohlen, verschiedene Mikroorganismen für das mikrobiologische Nachweisverfahren dieser antibiotischen Hemmstoffe heranzuziehen.

In der Zwischenzeit haben sowohl KELCH und CORETTI (57) als auch KISSLING (62) über Diffusionsteste zum Nachweis von Antibiotika in Fleisch und Organproben berichtet. In beiden Nachweisverfahren wird ein tetracyclinempfindlicher Bac. cereus-Stamm verwendet. KISSLING stellt aus dem zu untersuchenden Stoff einen Extrakt mit saurer Azetonlösung (1 Vol. 4-n-HCl, 6 Vol. Aqua dest., 13 Vol. Azeton) im Verhältnis 1 : 4 - 6 her. Während die Extraktion über Nacht im Kühlschrank erfolgt, wird der Auszug anschließend mit n-NaOH neutralisiert und erforderlichenfalls durch Filtrieren oder Zentrifugieren geklärt. Papierblättchen, die 0,1 ml dieses Extraktes aufsaugen, werden auf mit Bac. cereus vorbeimpften festen Nährböden aufgelegt; die Nährböden werden vor der 15- bis 18stündigen Bebrütung bei 27 ^{o} C eine Stunde bei + 4 ^{o} C gehalten, damit das Antibiotikum in den Nährböden diffundieren kann. Mit Hilfe einer vorher ermittelten Standardeichkurve kann nach Messung des Hemmringes die Menge des Antibiotikum annähernd ermittelt werden.

KELCH und CORETTI legen runde sterile Papierblättchen in Muskel- oder Organeinschnitte und bringen sie nach 5 min langer Aufsaugzeit auf 0,1 % Dextroseagarplatten (p_H 6,3), die vorher mit den Testkeimen beimpft wurden, und bebrüten diese. Die Nachweisgrenze des Aureomycins liegt nach

den Ergebnissen der Modellversuche mit bekannten Konzentrationen des Antibiotikum für beide Teste bei 0,1 µg/g.

Der Vorteil der Diffusionsteste liegt, sofern keine umständliche Extraktion vorgenommen werden muß, in der verhältnismäßig einfachen Technik, die auch bei geringen Mengen an Testflüssigkeit durchführbar ist. Nachteilig sind die einseitige Empfindlichkeit von Bac. cereus und die fast 18stündige Bebrütungsdauer.

Für einen Schnelltest bieten sich die Vorteile des flüssigen Nährbodens an, die in höherer Empfindlichkeit und in erheblich verkürzter Versuchsdauer bestehen. Nachteilig ist, daß größere Extraktmengen benötigt werden und daß die Ablesung im allgemeinen nicht so objektivierbar ist.

2. Mikrobiologische Grundlagen für Hemmstofftеste

a) Testmikroben

Für biologische Nachweismethoden auf Hemmstoffe finden verschiedene Mikroben, z.B. Aerobacter, Staphylokokken, Streptokokken, aerobe Sporenbildner und Hefen als Testkeime Verwendung, die hinsichtlich Wachstumsgeschwindigkeit, Temperaturoptimum und Ansprüchen an das Nährsubstrat erheblich differieren (11, 36, 38, 64, 66, 67, 95, 145). Auch in der Sensibilität sind sie sehr verschieden; einige weisen streng spezifische Sensibilitäten gegen bestimmte Antibiotikagruppen auf, während andere gegen zahlreiche Antibiotika unterschiedlicher Struktur empfindlich sind (11, 38, 64, 145).

Für den zu entwickelnden Kurzzeittest sind bei der Auswahl des Teststammes nachfolgende Anforderungen zu stellen:

a) hohe Vermehrungsgeschwindigkeit und leichte Züchtbarkeit, d.h. in einfachen Nährböden schnelles und üppiges Wachstum,
b) Wachstum in einem möglichst weiten p_H-Bereich,
c) genügend hohe Empfindlichkeit gegen verschiedenartige Antibiotika, Konservierungs- und Desinfektionsmittel,
d) Reduktion von Redoxindikatoren oder sonstige Sichtbarmachung des Wachstums.

Diesen Anforderungen entsprechen am ehesten Staphylokokken, die als Testkeime für Antibiotika und Desinfektionsmittel häufig Verwendung

finden (11, 28, 36, 64, 67, 126, 130, 145) und auch schon für Kurzzeitteste empfohlen wurden (64). Staphylokokken stellen keine besonderen Ansprüche an das Nährsubstrat, sie sind leichtzüchtbare und schnellwachsende Keime, deren Generationsdauer in Dextrose-Bouillon etwa 15 - 20 min beträgt (64). Auf Grund der zum Teil erheblichen Wirkungsabhängigkeit der Antibiotika, Konservierungs- und Desinfektionsmittel vom p_H-Wert des Nährmillieus (4, 38, 64, 73, 75, 112, 116, 118, 120, 124, 134, 140) und der damit verbundenen Nachweismöglichkeiten ist der für Staph. aureus angegebene sehr weite Wachstumsbereich von p_H 3,9 bis 8,9 mit einem Wachstumsoptimum bei p_H 6,4 von besonderem Interesse (36).

Für mikrobiologische Teste ist im Zusammenhang mit der Versuchsdauer sowohl die Einsaatmenge der Testkeime als auch der physiologische Zustand, in dem sich die Zellen einer Keimpopulation während der Antibiotikaeinwirkung befinden, von entscheidender Bedeutung (11, 38, 64, 67, 130, 138, 139). Hinsichtlich der Einsaatmenge ist zu berücksichtigen, daß die Gesamtheit der Kultur einer Bakterienpopulation ihrem Alter entsprechend aus a) vermehrungsfähigen, b) lebenden, jedoch nicht mehr vermehrungsfähigen und c) aus toten Zellen besteht. Die vermehrungsfähigen Zellen werden auch als lebende Zellen bezeichnet, d.h. sie sind subkulturfähig im Gegensatz zu den toten Zellen einer Kultur, zu denen sowohl die lebenden, aber nicht mehr vermehrungsfähigen, als auch die toten Zellen zählen. Nur die lebenden Zellen einer Testkultur sind für den Ausgang eines Testverfahrens von Bedeutung: sie stellen die eigentliche Einsaatgröße dar. Daher wird allgemein empfohlen, für Testzwecke nur junge, d.h. 18 - 24 Stunden alte Kulturen zu verwenden, da in diesen fast ausschließlich lebende Zellen vorhanden sind und die im Verhältnis nur in geringer Anzahl vorhandenen toten Zellen ohne Auswirkung auf das Testergebnis sind (64, 67, 123). Nicht nur die Anzahl der lebenden Zellen, sondern auch die hohe Sensibilität der Zellen verringert sich mit dem Alter einer Kultur. So stellten KÖRNLEIN, LEMBKE und MÖLLER (67) in Versuchen mit Staphylococcus aureus und Bacillus subtilis fest, daß geringe Schwankungen in der Dauer der Vorzucht oder kurzes Lagern um 0 °C nach der Bebrütung die Empfindlichkeit der Keime gegen Hydrochinon bei mittlerer Einsaat-Dichte (1,5 - 3,9 · 10^4 Keime/ml) nicht ändert; bei kleiner Einsaat (0,1 · 10^4 Keime/ml) zeigte sich die länger bebrütete Vorzucht von Staphylococcus aureus etwas, die von Bacillus subtilis signifikant resistenter. Bebrüten bei 37 °C während mehrerer Tage oder Lagern bei 0 °C über zwei Wochen erhöhte die Resistenz der Keime gegen Hydrochinon erheblich.

Der physiologische Zustand der Testorganismen ist nicht bei allen Hemmstoffen ausschlaggebend. So sind die meisten Desinfektions- und Konservierungsmittel Zellhüllen- und Protoplasmagifte, die ohne Unterschied, ob sich die Keime im Ruhestadium oder in der Vermehrung befinden, wirken (8, 15, 64, 131, 149). Antibiotische Substanzen wirken bakteriostatisch oder bakterizid, und zwar in Abhängigkeit nicht nur von ihrer Konzentration und von Einsaatgröße und Wachstumsgeschwindigkeit der Testkeime, sondern weitestgehend auch von deren augenblicklichem physiologischem Zustand (11, 38, 64, 123, 130, 138, 139). Besonders charakteristisch ist das refraktäre Verhalten von Keimen mit ruhendem Stoffwechsel gegenüber bestimmten Antibiotika. So gibt KLEIN (64) mehrere Versuche mit verschiedenen Antibiotika an, in denen die gleiche Antibiotikamenge unter sonst völlig gleichen Versuchsbedingungen aber bei verschiedenen Wachstumsphasen der Testkeime unterschiedlich wirkt. Zu gleichen Feststellungen kamen auch THOMSEN und CARLSON (130), die den Einfluß einer Penicillinkonzentration (5 O.E./ml) auf die einzelnen Wachstumsphasen einer Staphylococcus aureus-Kultur bei 37 ^{o} C untersuchten. Wurde gleichzeitig mit der Beimpfung das Penicillin zugesetzt, so zeigte sich lediglich in den anschließenden vier Stunden geringes Wachstum der Kultur, eine weitere Vermehrung aber unterblieb. In der logarithmischen Wachstumsphase zugesetztes Penicillin hemmte die Vermehrung der Zellen erst nach 4 - 5 Stunden vollständig. Erfolgte die Penicillinzugabe erst nach 12stündigem Wachstum der Staphylokokken, so war keine bakteriostatische Wirkung mehr zu beobachten. Nach CARLSON und BAUER (11) sind Staphylokokken ganz allgemein am Ende der Latenzzeit gegen chemische und physikalische Einflüsse, darunter auch gegen das Antibiotikum Nisin besonders empfindlich.

Zur Klärung dieses durch die einzelnen Wachstumsphasen bedingten unterschiedlichen Verhaltens der Zellen einer Testkultur verweist WALLHÄUSSER (138, 139) auf die mit wechselndem Alter vorhandene unterschiedliche Anzahl der Reduktionszentren einer Bakterienzelle und die dadurch bedingten Sensibilitätsänderungen gegenüber antibiotischen Stoffen. Nach seinen mit Bac. mycoides und Bac. subtilis durchgeführten Versuchen haben junge, in Teilung befindliche Zellen 16 und kurz vor der Anlage der Querwand sogar 32 Reduktionszentren, während bei einem Kulturalter von 8 - 16 Stunden Zellen vorherrschen, die nur noch 1 - 4, dafür aber größere Reduktionszentren aufweisen. Bei letzteren war die aktive Oberfläche der Reduktionszentren insgesamt stark vermindert und betrug im günstigsten Falle etwas mehr als die Hälfte der bei jungen Keimen vorhandenen Re-

duktionszentren. Hieraus schließt WALLHÄUSSER, daß die Sensibilität einer Bakterienzelle gegenüber einem Antibiotikumeffekt mit dem physiologischen Zustand einer Zelle wechselt und diesem entsprechend sich proportional der jeweils in der Zelle vorhandenen aktiven Gesamtoberfläche der Reduktionszentren verhält.

b) Nährmilieu

Hemmstoffnachweise werden bei 18- bis 24stündiger Bebrütung überwiegend als Diffusionsteste auf festen Nährböden, seltener in flüssigen Nährböden vorgenommen, da bei letzteren die Gefahr der Verunreinigung größer und die Kontrolle des Wachstums komplizierter ist. Für Kurzzeitteste, deren Durchführung besonders schnelles Wachstum der Keime erfordert, sind flüssige Nährböden das Mittel der Wahl, da im flüssigen Medium die Aufnahme der gelösten Hemmstoffe durch die Testorganismen von Anfang an gewährleistet ist (38, 64, 67).

Die Zusammensetzung des Nährbodens ist vom Nährstoffbedarf der Testkeime abhängig. Für die relativ anspruchslosen Staphylokokken genügen schon einfach zusammengesetzte Nährböden. Wichtige Bestandteile sind Peptone, die als N-Quelle fast stets in der Konzentration von 1 % zugesetzt und hinsichtlich ihrer Güte und Verwendbarkeit erhebliche Unterschiede aufweisen.

Nach EYER und v. SCHRADER-BEIELSTEIN (22, 23) haben die durch tryptische und peptische Verdauung gewonnenen Peptone hohen Gehalt an essentiellen Aminosäuren und niederen und höheren Peptiden und stellen daher keine eigentlichen Zusätze zum Fleischwasser dar, sondern sind in 2,5 %iger Lösung schon allein vollwertige Nährsubstrate. Einige Handelspeptone verdanken ihre guten Nährbodeneigenschaften u. a. kleinen Glukosemengen (etwa 1 °/oo). Verschiedene Keimarten, darunter auch Staphylokokken, erfuhren durch diese "Zuckerspitze" eine erhebliche Wachstumsbegünstigung (22).

Kohlehydrate werden den Nährböden auch als zusätzliche Energiequelle zugegeben. Im allgemeinen wird die von fast allen Keimen nutzbare Dextrose in 0,5 - 2,0 %iger Konzentration verwendet (36, 64, 145). Zu hohe Zusätze bewirken Wachstumshemmung bei Staphylokokken und anderen Eitererregern, wie dies ROEDERER (103) in 5 %igen Dextrosenährböden beobachtet hat. Diese unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse der Dextrosewirkung auf Staphylokokken geben Veranlassung, die Wirkung

verschiedener Dextrosekonzentrationen auf die Keime des Teststammes, besonders unter Berücksichtigung einer verkürzten aber intensiveren Bebrütungsdauer im Wasserbad zu überprüfen. Bei der Zusammensetzung eines Nährsubstrates für Testkeime sind auch die physikalisch-chemischen Bedingungen, z.B. p_H-Wert, Salzgehalt und Höhe der Bebrütungstemperatur zu berücksichtigen. Kochsalz muß aus Gründen der Isotonie einer ungepufferten Fleischbouillon in 0,5 %iger Konzentration hinzugefügt werden. Für gepufferte Fleischbouillon werden neben 0,2 % sekundärem Natrium- oder Kaliumphosphat 0,3 % Kochsalz zugesetzt (36, 64, 145).

Während mangelndes Nährstoffangebot das Wachstum der Testkeime verzögert, können bestimmte physikalisch-chemische Bedingungen die Wirksamkeit der Hemmstoffe positiv oder negativ beeinflussen; in beiden Fällen kann dadurch ein irreales Testergebnis bedingt werden. So ist für einen empfindlichen Streptomycinnachweis neben geringer Einsaatdichte der Testkeime ein p_H-Wert von 8,0 optimal, während für die Wirkung alkaliempfindlicher Tetracycline schwach saure p_H-Werte (5,1 bis 5,6) förderlich sind. Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration trifft in gleicher Weise für Penicillin und andere Antibiotika wie auch für die bereits besprochenen Konservierungsmittel zu (4, 34, 38, 64, 73, 75, 97, 107, 112, 118, 140, 145).

Auch bestimmte Stoffe können sich in einem Nährmilieu als Inhibitoren eventuell auch als Aktivatoren der antibakteriellen Wirkung bemerkbar machen (38, 64, 140, 145). Als Inhibitoren kommen in Betracht: spezifische Antagonisten, z.B. Penicilinase und Streptomycinase, ferner Eiweißbestandteile im tierischen oder menschlichen Körper, an welche die Hemmstoffe z.T. adsorbiert werden, wodurch deren wirksame Konzentration vermindert wird (60, 64, 94, 140, 145).

c) TTC als Wachstumsindikator

Da sich in Vorversuchen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) gegenüber anderen Redoxindikatoren am besten bewährt hat und auch weitere Wachstumsindikatoren, z.B. Feststellung der Säuerung, Nitratreduktion nicht in Betracht kamen, weil Lebensmittel tierischer Herkunft, ausgenommen Milch, einerseits im p_H sehr unterschiedlich sind und andererseits häufig Nitrat und Nitrit enthalten, so soll auch bei der Literaturbesprechung nur auf TTC eingegangen werden.

Dieser Stoff, erstmals im Jahre 1894 durch v. PECHMANN und RUNGE (104)

beschrieben, ist ein weißes, wasserlösliches, licht- und temperaturempfindliches Salz, das durch Reduktion in das wasserunlösliche und sauerstoffbeständige rote Formazan überführt wird.

Die Anwendung des Tetrazoliumsalzes als biologischer Redoxindikator ist auf den verschiedenen naturwissenschaftlichen Arbeitsgebieten weit verbreitet. So wird es zur Prüfung der Keimfähigkeit von Pflanzensamen verwendet (104) wie auch zum Nachweis reduzierender Zucker benutzt (135). In der Histologie findet TTC Anwendung zur Darstellung von Reduktionsorten im gesunden Gewebe (37) wie auch als Indikator für neoplastisches Zellwachstum, z.B. Tumorzellen (59) und Permeabilitätsstörungen an den Zellwänden (3). In der Bakteriologie hat seine Anwendung für die kulturelle Diagnostik von Bakterien Bedeutung erlangt (18, 63, 77, 125, 126, 127). KUHN und JERCHEL (72) stellten als besonderen Vorteil der Tetrazoliumsalze gegenüber den sonst zum Reduktasenachweis üblichen Farbstoffen, wie Methylenblau und Janusgrün, die Beständigkeit des Formazanrotes gegen Sauerstoff heraus. Die bei der Reduktion des TTC ablaufende Reaktion erfolgt nach JERCHEL und MÖHLE (52) als irreversibler Vorgang folgendermaßen:

$$\text{farbloses TTC} \xrightarrow{+\ 2\ H} \text{rotes Triphenylformazan.}$$

Nach den Mitteilungen von SIEGERT (111) sind Tetrazoliumsalze dem Curare ähnliche quarternäre Ammoniumverbindungen und daher in pharmakologischer und toxikologischer Hinsicht keineswegs indifferent. Die toxische Wirkung konnte durch WUNDT (147) und andere Autoren (28, 59, 63, 77, 102, 125, 126) auch für Keime nachgewiesen werden. TTC kann auf verschiedene Keimarten sowohl bakterizid wie auch bakteriostatisch wirken. Sofern TTC in einer der Keimart entsprechenden ungiftigen Menge angeboten wird, sollen nach WUNDT (147) und SCHÖNBERG (125, 126) alle Bakterien in der Lage sein, es zu Formazan zu reduzieren. Allerdings bestehen hinsichtlich des zeitlichen Ablaufes und der Intensität der Reduktionsvorgänge, auch in Abhängigkeit vom Nährmilieu (28), erhebliche individuelle Unterschiede zwischen verschiedenen Gattungen.

Die von GILLISSEN und BECHER (28) durchgeführten Untersuchungen ergaben sogar bei ein und derselben Gattung, z.B. Staphylococcus, erhebliche Unterschiede im Reduktionsvermögen des TTC. So soll "Staph. albus" TTC nur in großer Keimdichte und in Gegenwart von Glukose, Staph. aureus auch ohne Glukose, allerdings auch in gewisser Abhängigkeit von der Keimzahl reduzieren.

Das bei der Reduktion des TTC entstehende Formazan wird nach BIELIG, HAARDICK und KAUSCHE (6) durch fermentative Hydrierung in den Reduktionsorten der lebenden Bakterienzelle gebildet. Auch nach den Feststellungen anderer Autoren findet die Reduktion des TTC zu Formazan intrazellulär statt und beruht nicht auf reduzierenden Stoffwechselprodukten, die aus den Bakterien in die Nährlösung übergehen bzw. im Nährboden enthalten sein können (2, 6, 18, 28, 59, 63, 77, 102, 125, 126, 127, 137, 138, 139, 147).

Die Reduktion des TTC zu Formazan erfolgt in der Bakterienzelle bei p_H 6,0 - 8,0 (2, 28, 72, 139). Das Redoxpotential des TTC ist nach JERCHEL und MÖHLE (52) zwar vom p_H-Wert unabhängig, jedoch vermögen organische Stoffe, z.B. Ascorbinsäure, Glutathion, Cystein nur oberhalb von p_H 9,0, reduzierende Zucker nur oberhalb von p_H 11,0 TTC zu reduzieren (28, 72, 135, 139). Auch bei der bakteriellen Reduktion des TTC soll die Intensität der Formazanbildung in gewissem Maße doch vom p_H-Wert des Nährmilieus abhängig sein (2, 28). Allgemein wird ein schwach alkalisches p_H zwischen 7,0 und 8,0 als optimal empfohlen (2, 125). Bei schwach sauren p_H-Werten soll die verringerte Formazanbildung nach BAJUSZ (2) durch Anwendung von größerer Konzentration an TTC weitgehend ausgeglichen werden können.

Das TTC wurde von verschiedenen Autoren als biologischer Redoxindikator für antibakterielle Wertigkeitsbestimmungen eingesetzt. So hat es WALLHÄUSSER (136, 137) als Indikator für eine durch Antibiotika bedingte Bakterienhemmung auf Diffusionsplatten und im Schnelltest zum Nachweis von Antibiotika in Körperflüssigkeiten angewandt. NEAL und CALBERT (95, 96) haben ein Nachweisverfahren von Hemmstoffen in Milch ebenfalls unter Verwendung von TTC entwickelt. In Anlehnung an diese Autoren haben auch KOTTER und MUSPACH (70) bei der Untersuchung von Trockenmilch und Milcheiweißpräparaten und DRAGON (19) bei Untersuchung von Trinkmilch auf Hemmstoffe TTC als Indikator angewandt.
Bedeutungsvoll ist auch, daß Keime, die bereits bei der Einsaat tot sind, TTC nicht reduzieren (28).

Nach Feststellungen von KLEIN (63) zeigen nicht nur Tetrazoliumsalze von verschiedenen Firmen, sondern auch einzelne Herstellungschargen einer Firma unterschiedliche bakteriostatische und bakterizide Wirkungen, so daß stets eine vorherige Überprüfung der keimhemmenden Wirkung des TTC auf die entsprechende Keimart erforderlich sei.

d) Zeitpunkt der Ablesung

Die Ablesung von Hemmstofftesten kann erst dann erfolgen, wenn die Keime sich ausreichend entwickeln und die Hemmstoffe genügend lang einwirken konnten. Die Länge der Bebrütung kann die Wirkung der Antibiotika in positivem oder negativem Sinne beeinflussen. So wird bei längerer Bebrütungszeit die Hemmwirkung des Streptomycins ansteigen (64), während Penicillin-G (ungepuffert) nach WALTER und HEILMEYER (140) bei einem p_H zwischen 5,0 und 8,0 und einer Temperatur von 24 ^{o} C innerhalb 48 Stunden zu 50 % inaktiviert wird. KLEIN (64) rechnet für Penicillin bei 24stündigem Brutschrankaufenthalt (37 ^{o} C) und p_H 7,4 mit einem Titerverlust von 50 %. Unter den gebräuchlichen Antibiotika weist Chlortetracyclin die geringste Stabilität auf; es wird nach WALTER und HEILMEYER (140) bei p_H 7,0 bereits in 4 Stunden zu 50 % zerstört. HENNEBERG und WATERSTRAAT (38) stellten fest, daß die Wirkungseinbußen des Aureomycin selbst bei 37 ^{o} C geringer werden, sobald das Lösungsmittel einen p_H-Wert von 6,0 hat. Unter diesen Bedingungen konnte bis zu 6 Stunden noch 100 %ige Wirksamkeit der Anfangskonzentration des Tetracyclin ermittelt werden, die erst 24 Stunden nach Versuchsbeginn einen Verlust von 50 % zeigte. Bei einer Bebrütungstemperatur von 37 ^{o} C halten jedoch die Autoren nur einen Test im flüssigen Milieu für durchführbar und auch dann nur, wenn die Ablesung nach etwa 4 Stunden vorgenommen wird. Es ist erforderlich, daß das Keimwachstum in den Kontrollen vor dem Absinken der Tetracyclinwerte deutlich wird, da nach der Inaktivierung die anfängliche Bakteriostase in den hemmstoffhaltigen Proben wieder aufgehoben wird und dann kaum noch Unterschiede zu den Kontrollen erwartet werden können. KLEIN (64) empfiehlt aus gleichen Gründen zum Nachweis von Aureomycin den Schnelltest.

Bei der Festsetzung der Ablesungszeit ist auch die Reduktionszeit des als Indikator verwendeten 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorids (TTC) zu berücksichtigen; GILLISSEN und BECHER (28) empfehlen möglichst kurze Versuchszeiten. Für die Farbintensität ist neben den bereits besprochenen Faktoren, wie Keimdichte, physiologische Eigenart der Keime und pH des Milieus auch die Einwirkungszeit maßgebend. Bei hohen TTC-Konzentrationen kann jedoch der zeitliche Ablauf der TTC-Reduktion durch Keimabtötung oder bei wachsenden Keimen durch Erreichen des Maximaleffektes begrenzt werden (28).

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Vorversuche

1. Zur Auswahl der Testkeime

Für einen Schnelltest kommen als Testkeime nur schnellwachsende Mikroorganismen mit möglichst großer Empfindlichkeit gegen verschiedenartige Hemmstoffe in Betracht. So schieden auch stets einsatzbereite Sporenaufschwemmungen einiger antibiotikaempfindlicher aerober Sporenbildner (Bac. subtilis und Bac. cereus) nach einigen orientierenden Versuchen aus, da das Sichtbarwerden des Wachstums zu lange Zeit in Anspruch nahm. Einige schnellwachsende Keime, wie E.coli kamen wegen ungenügender Empfindlichkeit nicht in Betracht. Es blieben noch Staphylokokken übrig, und zwar Staphylococcus aureus SG 511 und ATCC Nr. 6538-P, von denen der letztgenannte Stamm stärkere Sensibilität und TTC-Reduktion aufwies.

2. Zur Festlegung der optimalen Bebrütungstemperatur

Von den geprüften Temperaturen zwischen 18 und 40 ^{o} C waren optimale Ergebnisse bei 37 ^{o} C zu erhalten, wobei die Bebrütung im Wasserbad durch unmittelbare Wärmeübermittlung schnelleres Wachstum der Keime bewirkte als die im Brutschrank. Der Nachteil der Brutschrankbebrütung kann jedoch dadurch ausgeglichen werden, daß die Röhrchen im warmen Wasser auf 37 bis 40 ^{o} C vorgewärmt und dann erst in den Brutschrank gestellt werden.

3. Zur Ermittlung des optimalen Nährsubstrates

In Vorversuchen erwies sich Bouillon in üblicher Zusammensetzung (Rindfleischwasser, 1 % Witte-Pepton siccum und 0,5 % Kochsalz) für die Testkeime als geeignetes Nährsubstrat. Die Bouillon zeigte 3 bis 4 Stunden nach der Bebrütung bei 37 ^{o} C mit bloßem Auge erkennbare diffuse Trübung. Um jeden unkontrollierbaren Glukosegehalt durch Pepton in der Testbouillon auszuschalten, wurde das glukosefreie Witte-Pepton als Nährbodenzusatz verwendet.

Zur Ermittlung der optimalen Dextrosekonzentration wurden Nährböden dextrosefrei und mit 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 %igen Zusätzen verwendet und

mit je 1 ml einer 18 Stunden alten Bouillonkultur, die 1 : 10 und 1 : 20 in Nährbouillon verdünnt waren, beimpft. Nach 3stündiger Bebrütung wurden unterschiedliche Mengen einer 4%igen TTC-Lösung zugegeben und nach weiteren 30 min die Formazanbildung beurteilt (Tab. 1).

Aus der Farbintensität des zu Formazan reduzierten TTC ist ersichtlich, daß ein 1 %iger Dextrosezusatz zur Nährbouillon die optimale Konzentration hinsichtlich des Wachstums der Testkeime und der TTC-Reduktion ist.

Tabelle 1

Einfluß verschiedener Dextrosezusätze auf das Wachstum der Testkeime und die TTC-Reduktion

Endverdünnung der Testkultur	Dextrosezusatz zur Nährbouillon in %	Formazanbildung nach Zugabe 4 %iger TTC-Lösung in ml		
		0,1	0,2	0,3
1 : 10	0,0	±	+	++
	0,5	±	(++)	+++
	1,0	+	++	++++
	1,5	+	++	++++
	2,0	+	++	++++
1 : 20	0,0	-	±	+
	0,5	±	+	++
	1,0	±	(++)	+++
	1,5	±	(++)	+++
	2,0	±	(++)	+++

Zeichenerklärung:

- = Nährboden unverändert (keine Formazanbildung)
± = hellorange
\+ = orange bis rosa
++ = hellrot
+++ = kirschrot (gegen indirektes Licht noch durchscheinend)
++++ = dunkelrot (nicht mehr durchscheinend)

Zwischentöne werden durch in Klammer gesetzte Zeichen angegeben, z.B. (++) = Farbton zwischen + und ++

4. Zur Ermittlung von optimaler Einsaatmenge und Versuchsdauer

Da zum Nachweis eines Hemmstoffes das in der Kontrolle erfolgte Wachstum mit demjenigen in den zu untersuchenden Röhrchen verglichen wird, muß sich die Einsaat in der Kontrolle nach möglichst kurzer Versuchsdauer so stark vermehrt haben, daß der gewählte Indikator maximal anzeigt. Bei der Festlegung von Einsaatmenge und Versuchsdauer ist zu berücksichtigen, daß bei großem Anfangskeimgehalt in hemmstoffhaltigen Röhrchen die Fermente der überimpften wirksam werden und die Wirkung einer geringen Hemmstoffmenge unter Umständen nach Inaktivierung durch eine relativ große Keimdichte kompensiert werden kann.

Folgende Versuche wurden zur Ermittlung von optimaler Keimeinsaat und Bebrütungsdauer unternommen:
Zu bestimmten Nährbodenmengen wurde soviel 18ständige Bouillonkultur gegeben, daß Kulturverdünnungen von 1 : 5, 1 : 10 und 1 : 20 entstanden, wobei jedes Röhrchen schließlich gleiche Mengen Flüssigkeit enthielt. Jeder Zusatz enthielt außerdem 1,0 E/ml Penicillin. Je 2 weitere Röhrchen der vier verschiedenen Kulturverdünnungen blieben ohne Penicillinzusatz als Wachstumskontrolle. Nach 3 bzw. bei weiteren Röhrchen nach 4 Stunden Bebrütungsdauer wurden je Röhrchen 0,3 ml einer 4 %igen TTC-Lösung hinzugefügt und nochmals 30 min bebrütet (Tab. 2).

Aus Tabelle 2 ist zu ersehen, daß die Kulturverdünnung 1 : 20 durch 1,0 E/ml Penicillin sowohl nach 3- als auch nach 4stündiger Bebrütung vollständig gehemmt wurde und in der Farbintensität der Bouillonkontrolle entsprochen hat. Die Kulturverdünnung 1 : 10 wurde nach 3stündiger Bebrütungsdauer nicht mehr vollständig gehemmt; es war bereits geringgradige Formazanbildung als Zeichen geringen Wachstums der Testkeime zu beobachten, die bei den 4 Stunden bebrüteten Ansätzen noch deutlicher war.

Die Kulturverdünnung 1 : 5 ergab auch in den hemmstoffhaltigen Röhrchen erhebliche Formazanbildung und schied für weitere Vorversuche aus. Hinsichtlich der Bebrütungsdauer ergab sich, daß schon nach 3 Stunden ausreichende Hemmung zu notieren war.

Tabelle 2

Ermittlung von Einsaatmenge und Versuchsdauer
unter Verwendung von Penicillin

Endverdünnung der Testkultur	Formazanbildung nach Bebrütung von 3 Std. in Ansätzen mit (1,0 E/ml)	ohne Penicillin	4 Std. in Ansätzen mit (1,0 E/ml)	ohne Penicillin
1 : 5	++	+++++	(+++)	++++++
1 : 10	±	+++	+	++++
1 : 20	-	++	-	+++
keimfrei	-	-	-	-

Zeichenerklärung: siehe Tabelle 1

Tabelle 3

Ermittlung der Einsaatgröße und Versuchsdauer
unter Verwendung von Chlortetracyclin

Endverdünnung der Testkultur	Formazanbildung nach Bebrütung von 3 Std. in Ansätzen mit (1,0 µg/ml)	ohne Chlortetracyclin	4 Std. in Ansätzen mit (1,0 µg/ml)	ohne Chlortetracyclin
1 : 5	++	+++++	++++	++++++
1 : 10	±	+++	++	++++
1 : 20	-	++	+	+++
keimfrei	-	-	-	-

Zeichenerklärung: siehe Tabelle 1

In gleicher Weise wurden Kulturverdünnungen und Bebrütungszeit auch mit Chlortetracyclin (CTC) getestet (Tab. 3). Die 3stündige Bebrütungsdauer war der 4stündigen erheblich überlegen. Während die Kulturverdünnung 1 : 20 durch 1,0 µg CTC Nährboden bei der kürzeren Versuchsdauer noch vollständig gehemmt wurde, war bei der längeren Versuchsdauer deutliche Formazanbildung als Zeichen eines bereits eingetretenen Wirkungsverlustes des CTC festzustellen. Auch die Kulturverdünnung 1 : 10 wurde während der kürzeren Versuchsdauer fast vollständig gehemmt, während nach 4 Stunden ebenfalls erhebliche Formazanbildung zu notieren war.

Diese Versuche ergaben, daß Kulturverdünnungen von 1 : 20 (0,5 ml 18stündige Bouillonkultur + 9,5 ml Nährbouillon) in Verbindung mit 3stündiger Bebrütungsdauer am geeignetsten sind. In den Wachstumskontrollen hatte innerhalb dieser Versuchsdauer bereits ausreichende Keimvermehrung (reichliche Formazanbildung) stattgefunden, um deutliche Kontraste in gehemmten Proben zu liefern.

5. Zur Festlegung der optimalen Indikatorkonzentration [1)]

Die mikrobielle TTC-Konzentration ist von Keimzahl, physiologischem Zustand der Keime, Versuchsdauer, p_H-Wert des Milieus und verwendeten TTC-Konzentrationen abhängig.

Zur Ermittlung einer geeigneten TTC-Konzentration und der optimalen Bebrütungszeit wurden in Anlehnung an NEAL und CALBERT (95) unterschiedliche Mengen 4 %iger wässeriger TTC-Lösung den mit verschiedenen Keimmengen beimpften und verschieden lang bebrüteten Ansätzen zugegeben und die Formazanbildung geprüft (Tab. 4 und 5).

Bouillonröhrchen wurden mit solchen Mengen Testkultur beimpft, daß die Ausgangskultur in einem Teil der Röhrchen 1 : 10, in einem weiteren 1 : 20 verdünnt wurde. Jeweils die Hälfte der beiden Röhrchen enthielt 0,5 µg Chlortetracyclin/ml Nährlösung. In gleicher Weise wurde ein Versuch mit Penicillin durchgeführt, wobei die Hemmstoffkonzentration 0,5 E/ml betrug. Allerdings wurden nur bei diesen Ansätzen 0,3 ml TTC-Lösung zugegeben, und die Bebrütungszeiten betrugen 120, 150 und 180 min. Anschließend erfolgte nochmalige Warmhaltung bei 37 °C für 30 min.

1) Für sämtliche Versuche wurde 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid der Firma E. Merck AG, Darmstadt, verwendet.

Tabelle 4

Ermittlung der optimalen TTC-Konzentration bei unterschiedlicher Einsaat und Versuchsdauer unter Verwendung von Chlortetracyclin

Zeit der TTC-Zugabe nach Bebrütung in min	Endverdünnung der Testkultur	Formazanbildung in chlortetracyclinhaltiger Kultur			Formazanbildung in hemmstoffreier Kultur			unbeimpfter Nährlösung		
		a	b	c	a	b	c	a	b	c
60		-	-	-	-	-	-	-	-	-
90		-	-	-	-	-	±	-	-	-
120		-	-	-	-	±	±	-	-	-
150	1 : 10	-	-	-	±	(++)	++	-	-	-
180		-	-	±	(++)	++	++++	-	-	-
210		±	±	+	(++)	+++	+++++	-	-	-
240		±	(++)	(+++)	++	(++++)	++++++	-	-	-
60		-	-	-	-	-	-	-	-	-
90		-	-	-	-	-	-	-	-	-
120		-	-	-	-	-	±	-	-	-
150	1 : 20	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-
180		-	-	-	(+)	(++)	+++	-	-	-
210		-	±	±	(+)	++	++++	-	-	-
240		±	±	+	+	(+++)	+++++	-	-	-

Zeichenerklärung

a = 0,1 ml 4 %iger TTC-Lösung
b = 0,2 ml " "
c = 0,3 ml " "

Tabelle 5

Formazanbildung in penicillinhaltigen und -freien Kulturen nach Zusatz von 0,3 ml 4 %igem TTC

Zeit der TTC-Zugabe nach Bebrütung in min	Endverdünnung der Testkultur	Penicillin-Endkonzentration 0,5 E/ml	Wachstumskontrolle	Bouillonkontrolle
120		-	±	-
150	1 : 10	±	++	-
180		±	++++	-
120		-	±	-
150	1 : 20	-	+	-
180		±	+++	-

Die Versuche (Tab. 4 und 5) lassen erkennen, daß die Formazanbildung bei höherer Keimdichte rascher und intensiver einsetzt, allerdings ist zu berücksichtigen, daß die Empfindlichkeit, wie bereits festgestellt, mit schwächerer Keimdichte erhöht wird.

Die TTC-Zugabe von 0,3 ml erwies sich allgemein als am geeignetsten.

Nach diesen Versuchen ist eine 3stündige Bebrütung mit einer Kulturendverdünnung von 1 : 20 und 0,3 ml TTC-Zugabe für einen schnellen und ausreichend sicheren Nachweis von 0,5 µg CTC/ml Nährlösung am besten geeignet, wenn auch spätere Ablesungen noch günstigere Farbunterschiede ergeben.

Die vergleichsweise mit Penicillin durchgeführten Versuche brachten ähnliche Ergebnisse (Tab. 5), allerdings waren bei dichterer Einsaat (1 : 10) noch deutlichere Unterschiede zwischen Kontroll- und hemmstoffhaltigen Proben vorhanden. Aus beiden Versuchen (Tab. 4 und 5) kann geschlossen werden, daß sich die Kultur bei etwa 150 min Bebrütungsdauer in der logarithmischen Wachstumsphase befindet, da nämlich nach weiteren 30 min, also nach einer Generation, semiquantitativ eine doppelt so starke Formazanbildung zu beobachten war. Die Bebrütungsdauer sollte also auf jeden Fall 180 min betragen, zumal auch noch kein merklicher Wertigkeitsverlust des labilen CTC festzustellen war. Erst nach 240 min war die Wirkung des CTC deutlich beeinträchtigt.

Abschließend war noch zu prüfen, inwieweit die Einsaat allein schon geeignet ist, Formazan zu bilden. Dazu wurden Bouillonröhrchen mit 9,0 bzw. 9,5 ml einer 18stündigen Bouillontestkultur beimpft, so daß die Ausgangskultur in Endverdünnungen von 1 : 10 bzw. 1 : 20 vorlag und sofort nach der Beimpfung sowie nach 3stündiger Bebrütung mit 0,1, 0,2 und 0,3 ml 4 %iger TTC-Lösung versetzt. Die nach der Bebrütung mit TTC versetzten Proben wurden weitere 30 min bei 37 °C gehalten. Die Proben, bei denen der TTC-Zusatz unmittelbar nach der Beimpfung erfolgte, wurden 3 1/2 Stunden bebrütet und mit den übrigen Proben anschließend verglichen (Tab. 6a).

Tabelle 6a

Formazanbildung unmittelbar nach der Einsaat und nach 180 min Bebrütungsdauer

Endverdünnung der Testkultur	Zeit der TTC-zugabe nach Bebrütung in min	Formazanbildung nach Zugabe von 4 %iger TTC-Lösung		
		0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml
1 : 10	0	±	±	-
	180	(+)	++	++++
1 : 20	0	-	-	-
	180	±	(++)	+++

Aus den Versuchen kann entnommen werden, daß die Einsaat selbst nach 3 1/2stündiger Bebrütung keine wesentliche Formazanbildung verursachte, wenn TTC unmittelbar nach der Beimpfung zugegeben wurde. Formazanbildung war überhaupt nur bei der dichteren Keimeinsaat (1 : 10) zu beobachten und selbst dort nur bei den geringeren TTC-Konzentrationen, woraus entnommen werden kann, daß alle die gewählten TTC-Zusätze das Bakterienwachstum erheblich und zum Teil total hemmen. Bei der schwächeren Keimdichte war in jedem Fall totale Hemmung zu beobachten.

Erfolgte der TTC-Zusatz nach der Bebrütung, so war zumindest bei der stärkeren TTC-Konzentration starke Formazanbildung gegeben.

In weiteren Versuchen wurde geprüft, wie die Formazanbildung in Abhängigkeit vom p_H-Wert erfolgt (Tab. 6b).

Tabelle 6b

Ermittlung der optimalen Formazanbildung in Abhängigkeit vom p_H-Wert

p_H-Wert der Testbouillon	Endverdünnung der Testkultur	Formazanbildung bei Zugabe von 0,3 ml	0,4 ml	0,5 ml	0,6 ml
		4 %iger TTC-Lösung			
8,0	1 : 10	++++	++++	++++	++++
	1 : 20	+++	+++	+++	+++
7,2	1 : 10	(++++)	(++++)	(++++)	(++++)
	1 : 20	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
6,5	1 : 10	++	(+++)	+++	+++
	1 : 20	+	(++)	++	++

Nach diesen Versuchen wird die Formazanbildung mit absinkendem p_H-Wert schwächer und ist gerade in dem p_H-Bereich, der nicht nur für einige Hemmstoffe ein Wirkungsoptimum, sondern auch für die Testkeime optimale Wachstumsbedingungen bietet (p_H 6,5) gering. Daher werden die Hauptversuche sowohl bei p_H 6,5, als auch bei p_H 8,0 vorgenommen.

6. Ermittlung des optimalen Alters der Testkultur

In weiteren Versuchen war noch zu prüfen, bis zu welchem Alter Kulturen verwendet werden können und inwieweit Überimpfungen der Stammkultur die Sensibilität beeinflussen. Dazu wurden Kulturen 18 Stunden bebrütet und bis zu 120 Stunden unter Lichtabschluß bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Von den verschieden lang gelagerten Kulturen wurden Bouillonröhrchen, die unterschiedliche Penicillinkonzentrationen enthalten hatten, beimpft (Endverdünnung 1 : 10 und 1 : 20) und nach 3stündiger Bebrütung mit 0,3 ml 4 %iger TTC-Lösung versetzt.

Die Versuchsergebnisse (Tab. 7) zeigen, daß die Sensibilität der gelagerten Kulturen bis zu 36 Stunden (von der Überimpfung an gerechnet) voll erhalten bleibt; bei 48 Stunden alten Testkulturen ist bereits geringgradiger, mit weiter zunehmendem Alter starker Sensibilitätsabfall festzustellen. Für die weiteren Versuche wurden daher ausschließlich Testkulturen bis zu

einem Alter von höchstens 36 Stunden, von der Beimpfung an gerechnet, verwendet. Die stärker verdünnte Kultur erwies sich auch unter diesen Bedingungen als sensibler.

Für die bisherigen Versuche wurden nach Empfehlungen von WINKLE (145) ausschließlich Testkulturen des auf Schrägagar gehaltenen Teststammes nach dreimaliger Bouillonpassage verwendet. Da dies unter praktischen Verhältnissen nicht ohne weiteres möglich ist, wurde die Sensibilität auch des auf Schrägagar gehaltenen Teststammes nach dem Überimpfen in Bouillon sowie zwei-, drei- und viermaliger Bouillonpassage untersucht. Die Empfindlichkeit wurde wie im vorhergehenden Versuch an einer Penicillinverdünnungsreihe geprüft. Es wurde nur die stärker verdünnte Einsaat (1 : 20) gewählt (Tab. 8).

Aus diesem Versuch ist ersichtlich, daß eine gleichbleibende Testkeimsensibilität der Testkultur tatsächlich erst mit der dritten Bouillonpassage des auf Schrägagar gehaltenen Teststammes gegeben ist.

Tabelle 7

Sensibilität verschieden alter Bouillonkulturen
Formazanbildung bei Ansätzen
mit Penicillin (in E/ml)

Testkultur Alter in Stunden	Endverdünnung	0,5	0,25	0,12	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	0,001	0,0008	ohne Penicillin
18	1 : 10	±	+	(++)	++	(+++)	+++	++++	++++	++++	++++	++++
24		±	+	(++)	++	(+++)	+++	++++	++++	++++	++++	++++
36		±	+	(++)	++	(+++)	+++	++++	++++	++++	++++	++++
48		±	+	++	(+++)	+++	(++++)	++++	++++	++++	++++	++++
72		(+)	(++)	++	(+++)	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
96		(+)	++	(+++)	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
120		+	(+++)	+++	(++++)	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
18	1 : 20	±	±	±	+	(++)	++	+++	++++	++++	++++	++++
24		±	±	±	+	(++)	++	+++	++++	++++	++++	++++
36		±	±	±	+	(++)	++	+++	++++	++++	++++	++++
48		±	±	(+)	(++)	++	(+++)	(++++)	++++	++++	++++	++++
72		±	±	+	++	(+++)	+++	++++	++++	++++	++++	++++
96		±	(+)	(++)	(+++)	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
120		(+)	+	++	+++	(++++)	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

Tabelle 8

Sensibilität der Testkeime nach Bouillonpassagen
Formazanbildung bei Ansätzen
mit Penicillin (in E/ml)

Testkultur Bouillon-passagen	Endver-dünnung	0,5	0,25	0,12	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	0,001	0,0008	ohne Penicillin
1 mal	1 : 20	+	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
2 mal	1 : 20	±	±	+	(++)	(+++)	+++	++++	++++	++++	++++	++++
3 mal	1 : 20	±	±	±	+	(++)	++	+++	++++	++++	++++	++++
4 mal	1 : 20	±	±	±	+	(++)	++	+++	++++	++++	++++	++++

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

II. Hauptversuche

1. Sensibilität des TTC-Testes bei Zusatz verschiedener Hemmstoffe zu Nährlösungen

In den folgenden Untersuchungen werden die Hemmstoffe: Penicillin (Penicillin-G-Kalium BAYER), Chlortetracyclin (Aureomycin Testsubstanz, Cyanamid GmbH), Streptomycin (Streptomycinsulfat für Testzwecke, BAYER), Sorbinsäure (Riedel de HAEN AG), Benzoesäure, Hexamethylentetramin, Borsäure und eine Ampholytseife (Desinfektionsmittel Tego 51) unter den in den Vorversuchen ermittelten optimalen Bedingungen auf ihre Wirkung gegenüber den Testkeimen geprüft. Die in den Ansätzen angegebenen Hemmstoffverdünnungen wurden durch Zugabe von jeweils 0,1 ml einer entsprechenden Vorverdünnung erreicht. Durch diese Zugabe wurde das Substrat nur so unwesentlich verdünnt, daß dies vernachlässigt werden kann.

Das Alter der Kultur betrug im allgemeinen 18 - 20 Stunden; die Kulturverdünnung betrug im allgemeinen im Ansatz sowohl 1 : 10 als auch 1 : 20. Bei Streptomycin wurde auch die Testkulturendverdünnung 1 : 200 angewandt, nachdem sie sich in Vorversuchen als optimal erwiesen hatte.

Die Lösung der Antibiotika (Penicillin, Chlortetracyclin, Streptomycin) erfolgte im m/15 Phosphatpuffer. Sorbin- und Benzoesäure wurden 10 %ig in 96 %igem Alkohol gelöst. Die Versuche sind in den Tabellen 9 - 16 zusammengefaßt. Tabelle 17 enthält die Grenzwerte aus den Tabellen 9 - 16, bei denen noch deutliche Hemmung festzustellen war.

Tabelle 9

Empfindlichkeit des TTC-Testes gegenüber Penicillin

Formazanbildung bei verschiedenen Penicillinkonzentrationen (in E/ml)

p_H der Bouillon	Endverdünnung der Testkult.	0,5	0,25	0,12	0,062	0,031	0,015	0,007	0,0035	0,0017	0,0008	penicillinfrei
8,0	1 : 10	±	±	±	+	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
	1 : 20	±	±	±	+	++	+++	(++++)	++++	++++	++++	++++
6,5	1 : 10	±	±	+	(++)	++	(+++)	+++	++++	++++	++++	++++
	1 : 20	-	±	(+)	+	(++)	++	(+++)	+++	(++++)	++++	++++

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

Tabelle 10

Empfindlichkeit des TTC-Testes gegenüber Chlortetracyclin (CTC)

Formazanbildung bei verschiedenen Chlortetracyclinkonzentrationen (in µg/ml)

p_H der Bouillon	Endverdünnung der Testkultur	1,0	0,5	0,25	0,12	0,062	0,031	0,015	0,0078	0,0039	0,0019	CTC-frei
8,0	1 : 10	±	±	±	±	+	++	+++	++++	++++	++++	++++
	1 : 20	-	-	±	±	+	++	+++	++++	++++	++++	++++
6,5	1 : 10	±	±	±	±	±	±	+	(++)	++	++++	++++
	1 : 20	-	-	-	-	-	±	±	+	(++)	+++	++++

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

Tabelle 11

Empfindlichkeit des TTC-Testes gegenüber Streptomycin

Formazanbildung bei verschiedenen Streptomycinkonzentrationen (in µg/ml)

p_H der Bouillon	Endverdünnung der Testkultur	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,155	0,075	0,037	0,018	streptomycinfrei
8,0	1 : 10	±	±	±	±	±	±	±	+	++	+++	(++++)	++++	++++	++++
	1 : 20	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	++	+++	++++	++++
	1 : 200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	++++
6,5	1 : 10	-	-	-	-	±	+	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	1 : 20	-	-	-	-	-	+	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	1 : 200	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	++++	++++	++++	++++

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

Tabelle 12

Empfindlichkeit des TTC-Testes gegenüber Sorbinsäure

Formazanbildung bei verschiedenen Sorbinsäurekonzentrationen (in µg/ml)

p_H der Bouillon	Endverdünnung der Testkultur	100	500	250	125	62	31	15	7	3	1	sorbinsäurefrei
8,0	1 : 10	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	1 : 20	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
6,5	1 : 10	±	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	1 : 20	-	+	(++)	++	(+++)	+++	++++	++++	++++	++++	++++

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

Tabelle 13

Empfindlichkeit des TTC-Testes gegenüber Benzoesäure

Formazanbildung bei verschiedenen Benzoesäurekonzentrationen (in µg/ml)

p_H der Bouillon	Endverdünnung der Testkultur	1000	500	250	125	62	31	15	7	3	1	benzoesäurefrei
8,0	1 : 10	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	1 : 20	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
6,5	1 : 10	++	+++	(++++)	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	1 : 20	±	+	++	(+++)	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

Tabelle 14

Empfindlichkeit des TTC-Testes gegenüber Hexamethylentetramin

Formazanbildung bei verschiedenen Hexamethylentetraminkonzentrationen (in µg/ml)

PH der Bouillon	Endverdünnung der Testkultur	100	500	250	125	62	31	15	7	3	1	hexamethylentetraminfrei
8,0	1 : 10	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	1 : 20	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
6,5	1 : 10	+	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	1 : 20	±	+	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

Tabelle 15

Empfindlichkeit des TTC-Testes gegenüber Borsäure

Formazanbildung bei verschiedenen Borsäurekonzentrationen (in µg/ml)

p_H der Bouillon	Endverdünnung der Testkultur	1000	500	250	125	62	31	15	7	3	1	borsäurefrei
8,0	1 : 10	+	++	(+++)	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	1 : 20	+	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
6,5	1 : 10	±	+	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	1 : 20	+	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

Tabelle 16

Empfindlichkeit des TTC-Testes gegenüber einer Ampholytseife (Tego 51)

Formazanbildung bei verschiedenen Verdünnungen der Original-Tego 51-Lösung

p_H der Bouillon	Endverdünnung der Testkultur	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$6,2 \cdot 10^{-5}$	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$7,2 \cdot 10^{-6}$	$3,6 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{-6}$	tego-frei
8,0	1 : 10	-	-	-	-	+	++	++++	++++	++++	++++	++++
	1 : 20	-	-	-	-	+/-	+	++	+++	++++	++++	++++
6,5	1 : 10	-	-	-	+	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	1 : 20	-	-	-	-	+	+++	++++	++++	++++	++++	++++

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

Tabelle 17

Nachweisgrenzen für in Nährbouillon gelöste Hemmstoffe bei p_H 8,0 und p_H 6,5 (Zusammenfassung der Grenzwerte aus den Tab. 9 - 16)

Hemmstoff	Nachweisgrenzen bei Kulturendverdünnung 1 : 10		1 : 20	
	p_H 8,0	p_H 6,5	p_H 8,0	p_H 6,5
Penicillin (E/ml)	0,015	0,007	0,007	0,0017
Chlortetracyclin (µg/ml)	0,015	0,0039	0,015	0,0019
Streptomycin x) (µg/ml)	0,075	0,625	0,037	0,625
Sorbinsäure (µg/ml)	1000	250	500	31
Benzoesäure (µg/ml)	1000	250	500	62
Hexamethylentetramin (µg/ml)	>1000	250	>1000	125
Borsäure (µg/ml)	125	125	250	250
Tego 51 (Verdünnung d. Originallösung)	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$6,2 \cdot 10^{-5}$	$7,2 \cdot 10^{-6}$	$3,1 \cdot 10^{-5}$

x) Bei einer Verringerung der Einsaat um das 200fache konnte die Nachweisgrenze des Streptomycins bei p_H 8,0 auf 0,018 µg/ml und bei p_H 6,5 auf 0,155 µg/ml gesteigert werden (s. Tabelle 11).

Aus den Tabellen 9 - 17 ist zu entnehmen, daß die meisten Hemmstoffe im sauren Bereich besser wirken als im alkalischen. Bei p_H 8,0 wirkte Streptomycin erheblich und Tego geringgradig stärker, während Borsäure bei beiden p_H-Werten gleich wirkte.

Die Empfindlichkeit des Testes war bei geringerer Keimeinsaat (1 : 20 Kulturendverdünnung) stärker; lediglich Borsäure war bei stärkerer Keimeinsaat etwas früher nachweisbar.

Es sei ausdrücklich betont, daß klare Nährsubstrate vorgelegen haben, bei denen auch geringe Farbintensitätsunterschiede berücksichtigt werden konnten. Die Grenzwerte stellen Konzentrationen dar, bei denen eben noch ein Unterschied zu sehen war. Deutlich unterschiedene Formazanbildung war meist erst bei doppelt so hohen oder noch höheren Hemmstoffkonzentrationen zu beobachten.

2. Praktische Anwendung des TTC-Testes

Da die bisherigen Ergebnisse nur für den Nachweis von Hemmstoffen in Nährlösungen gelten, sollte geprüft werden, wie der Test zum Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln, insbesondere in Fleisch geeignet ist, das direkt einer Konservierung unterzogen wurde oder in dem die Hemmstoffe noch auf Grund einer Behandlung des lebenden Tieres mit Antibiotika vorhanden sind.

a) Hemmstoffnachweis bei Fleisch, das mit Chlortetracyclin behandelt wurde

Das Fleisch, wie auch in den weiteren Untersuchungen die einzelnen Organe, wurden zunächst, falls erforderlich, von Fett- und Bindegewebe befreit (Hilusfett der Organe etc.) und anschließend mit einem Fleischwolf (mittlere Scheibe) zerkleinert. Das zerkleinerte Material wurde dann im Verhältnis 1 : 2 mit Wasser, das 1 % Pepton-Witte, 1 % Dextrose und 0,5 % Kochsalz enthielt, aufgeschwemmt und unter wiederholtem Schütteln gut durchgemischt. Nach 10 - 15 min Extraktionszeit wurde dieser Ansatz 5 min im Wasserbad bei 80 ^{o} C erhitzt, um eventuell unerwünschte Keime auszuschalten, die insbesondere dann, wenn sie gegen Hemmstoffe empfindlich sind, ein fehlerhaftes Testergebnis verursachen könnten. Die Erhitzung soll nicht länger als 5 min erfolgen und durch Thermometer im Extrakt kontrolliert werden. Schnelle und gleichmäßige Erhitzung ist nur in kleineren Gefäßen gewährleistet.

Anschließend wurde der Extrakt durch Filtration (grobes Filterpapier) geklärt und die Hälfte davon auf p_H 6,5 eingestellt. Wenn mit der Anwesenheit von Streptomycin gerechnet werden muß, ist auch ein Ansatz mit p_H 8,0 einzuschalten.

Ein 1 kg schweres Stück Rindfleisch wurde in 3 Liter 0,3 %iger Kochsalzlösung, die 10 µg/ml Chlortetracyclin (Aureomycin) enthielt, 2 Stunden

lang bei ± 2 °C aufbewahrt. Danach ließen wir die ihm anhaftende Flüssigkeit gut abtropfen. Das Fleischstück wurde für den Hemmstoffnachweis im Kühlschrank (± 2 °C) aufbewahrt. Zur weiteren Untersuchung wurde aus dem getauchten Fleisch ein Extrakt nach beschriebener Methode hergestellt.

Als Nährsubstrat für die Wachstumskontrolle wurde in gleicher Weise ein Extrakt aus hemmstoffreiem Rindfleisch hergestellt. Der Nachweis an dem getauchten Fleisch wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen in 24stündigem Abstand (24 - 120 h) nach dem Tauchen durchgeführt. 9,0 ml und 9,5 ml unverdünnte hemmstoffhaltige Bouillon sowie 9,0 ml und 9,5 ml dieser Bouillon, die 1 : 10, 1: 20 und 1 : 100 mit hemmstoffreier Kontrollbouillon verdünnt war und 9,0 ml sowie 9,5 ml hemmstoffreie Bouillon werden mit je 1,0 ml (Kulturendverdünnung 1 : 10) bzw. 0,5 ml (Kulturendverdünnung 1 : 20) 20stündiger Bouillonkultur des Staphylococcus aureus ATCC 6538-P beimpft und nach 3stündiger Bebrütung im Wasserbad (37 °C) mit je 0,5 ml 2 %iger TTC-Lösung vermischt. Nach nochmaliger Bebrütung von 30 min wurde die Formazanbildung abgelesen (Tab. 18).

Tabelle 18

Hemmstoffnachweis bei in Chlortetracyclinlösung (10 µg/ml) getauchtem Rindfleisch

Zeit nach Tauchung in Stund.	Formazanbildung bei Ansätzen mit der Testkulturendverdünnung 1 : 10 in Bouillon hergestellt aus getauchtem Fleisch					Formazanbildung bei Ansätzen mit der Testkulturendverdünnung 1 : 20 in Bouillon hergestellt aus getauchtem Fleisch				
	unverdünnt	verdünnt mit hemmstoffreier Bouillon 1:10	1:20	1:100	hemmstoffreier Bouillon	unverdünnt	verdünnt mit hemmstoffreier Bouillon 1:10	1:20	1:100	hemmstoffreier Bouillon
24	-	±	±	+	++++	-	-	-	±	++++
48	±	±	±	++	++++	-	-	±	+	++++
72	±	±	+	+++	++++	-	-	±	++	++++
96	±	+	++	++++	++++	-	±	+	(++++)	++++
120	±	(++)	+++	++++	++++	-	±	++	++++	++++

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

Aus Tabelle 18 ist zunächst zu entnehmen, daß das in dem getauchten Fleisch vorhandene CTC durch die 5 min dauernde Erhitzung auf 80 °C nicht inaktiviert wurde, jedoch im Laufe der Lagerung eine deutliche Abnahme an wirksamem Hemmstoff zu beobachten war. In der unverdünnten CTC-haltigen Bouillon war auch noch 120 Stunden nach dem Tauchen des Fleisches vollständige Hemmung der Testkeime zu beobachten. Selbst in dem mit Kontrollbouillon 1 : 10, 1 : 20 und 1 : 100 verdünnten aureomycinhaltigen Muskelextrakten war zunächst zum Teil noch vollständige Hemmung festzustellen.

b) Hemmstoffnachweis in Fleisch und Organen eines vor der Schlachtung mit Penicillin behandelten Schweines

Einem Schwein (Lebendgewicht von 128 kg) wurden 500 000 E Penicillin (Aquacillin comp., Depot-Penicillin, BAYER, Leverkusen) intramuskulär am Hals 10 cm hinter dem Ohrgrund injiziert. Die Schlachtung dieses Schweines erfolgte 22 Stunden nach der Injektion. 9 Stunden nach der Schlachtung wurden aus Muskulatur, Schultergegend, Leber, Milz und Niere nach der vorher beschriebenen Methode Extrakte hergestellt (p_H 6,5) und im TTC-Hemmstofftest geprüft. Die zweite Niere wurde 37 Stunden nach der Schlachtung untersucht. Die Fleisch- und Organextrakte dieses Schweines wurden unverdünnt und in den Verdünnungen 1 : 10, 1 : 20 und 1 : 100 hergestellt. Die Verdünnungen wurden mit entsprechenden Extrakten, die aus Fleisch und Organen eines "antibiotikafreien" Schweines hergestellt worden waren und gleichzeitig auch als Kontrollen dienten (Tab. 19), vorgenommen.

Tabelle 19

Hemmstoffnachweis in Fleisch und Organen eines mit Penicillin behandelten Schweines

Tierkörperteil	Zeit der Untersuchung in Stunden nach Injekt.	Zeit der Untersuchung in Stunden nach Tod	Endverdünnung der Testkultur	Formazanbildung in Extrakten aus Fleisch bzw. Organen des Versuchs-Schweines: unverdünnt	verdünnt mit hemmstoffreier Bouillon 1:10	1:20	1:100	hemmstofffreie Bouillon
Muskulatur	31	9	1 : 10	++	++++	++++	++++	++++
			1 : 20	+	++++	++++	++++	++++
Leber	31	9	1 : 10	+	++++	++++	++++	++++
			1 : 20	±	++++	++++	++++	++++
Milz	31	9	1 : 10	++	++++	++++	++++	++++
			1 : 20	(+)	++++	++++	++++	++++
Niere	31	9	1 : 10	±	++++	++++	++++	++++
			1 : 20	-	+++	++++	++++	++++
Niere	59	37	1 : 10	+	++++	++++	++++	++++
			1 : 20	±	++++	++++	++++	++++

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

Dem Versuch ist zu entnehmen, daß der Penicillinnachweis mit Sicherheit nur in unverdünnten Extrakten aus Fleisch und Organen des mit Penicillin behandelten Schweines zu führen war. Der Hemmstoffnachweis ergab in der Niere vollständige Hemmung, die bei stärkerer Keimeinsaat etwas geringer war. In der Leber war die Hemmung etwas schwächer, am schwächsten in Milz und Muskulatur.

Der 37 Stunden nach der Schlachtung mit der zweiten Niere durchgeführte Hemmstoffnachweis ergab bei der Kulturverdünnung 1 : 20 noch fast vollständige, bei der Kulturverdünnung 1 : 10 noch starke Hemmung; während der Lagerung war also nur eine geringgradige Inaktivierung des Penicillins erfolgt.

c) Hemmstoffnachweis in Organen von Schweinen, die Chlortetracyclin in nutritiv wirksamer Dosis erhalten hatten

Nieren und Lebern von 15 Schweinen, die mehrere Wochen hindurch 20 mg Chlortetracyclin (Aureomycin) pro kg Futter erhalten hatten, wurden 24 Stunden nach der Schlachtung mittels Hemmstofftest untersucht.

Die Herstellung und Beimpfung der Extrakte (p_H 6,5) erfolgte in der bereits beschriebenen Weise; als Kontrollen dienten Niere und Leber eines antibiotikafrei gefütterten Schweines (Tab. 20).

Den Untersuchungen ist zu entnehmen, daß Hemmstoffe nicht nachweisbar waren. Lediglich bei 3 Nieren und 3 Lebern von verschiedenen Schweinen war eine geringgradig schwächere Formazanbildung als in der Kontrolle vorhanden, was jedoch noch nicht auf das Vorhandensein von Hemmstoff schließen läßt, da geringe Unterschiede auch methodisch begründet sein können.

Tabelle 20

Hemmstoffnachweis in Organen von Schweinen, die mit dem Futter Chlortetracyclin in nutritiv wirksamer Menge erhalten hatten

Schwein-Nr.	Formazanbildung in Extrakten aus Niere	Leber
4	(++++)	(++++)
10	++++	++++
14	++++	(++++)
15	(++++)	
24	++++	
25	++++	++++
27	(++++)	++++
30	++++	++++
31	++++	++++
34	++++	
35	++++	(++++)
36	++++	++++
37	++++	++++
38	++++	
40	++++	
Kontrolle	++++	++++

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

d) Hemmstoffnachweis in Muskulatur und Organen von Kälbern, denen Chlortetracyclin in nutritiv und therapeutisch wirksamen Mengen verabreicht worden war

Fleisch und Organe von 7 Kälbern, die mit dem Futter längere Zeit täglich 80 mg Aureomycin pro Tier erhalten haben, wurden 24 Stunden nach der Schlachtung untersucht. 2 Kälber, die einmalig je 1000 mg Aureomycin per os erhalten hatten, wurden 24 Stunden danach geschlachtet; Fleisch und Organe wurden 30 Stunden nach der Schlachtung untersucht. 4 Kälber, die einmalig je 1500 mg Aureomycin per os erhalten hatten, wurden 36 Stunden

danach geschlachtet; Fleisch und Organe wurden 48 Stunden nach der Schlachtung untersucht. Die Extrakte wurden in bereits beschriebener Weise hergestellt und beimpft. Als Kontrolle wurden Extrakte aus Muskulatur und den entsprechenden Organen eines antibiotikafreien Kalbes hergestellt (Tab. 21).

Die untersuchten Lebern und Milzen wiesen starke Schwellung und vermehrte Blutfülle auf, da sie aus einem Versuch stammten, in dem Kälber mit Salmonellen infiziert worden waren. Hierdurch bekamen die Extrakte braunrote Farbe, so daß die Beurteilung der Formazanintensität sehr erschwert war. Dagegen war die Beurteilung der Extrakte aus Muskulatur und Niere nicht beeinträchtigt.

Tabelle 21

Hemmstoffnachweis in Muskulatur und Organen von Kälbern, denen Aureomycin in nutritiv und therapeutisch wirksamen Mengen verabreicht worden war

Kalb-Nr.	Aureomycinmenge	Formazanbildung in den Extrakten aus			
		Niere	Muskulatur	Leber	Milz
1	längere Zeit täglich 80 mg	(++++)	++++		
2		+++	++++		
3		+++	++++		
4		(++++)	++++		
5		(++++)	++++		
6		+++	++++	+++	++++
7		(++++)	++++	++++	++++
8	1000 mg	±	(++++)	+++	++++
9		±	+++	++++	++++
10	1500 mg	-	++		
11		-	+++		
12		-	+++		
13		±	(++++)		
Kontrolle		++++	++++	++++	++++

Zeichenerklärung siehe Tabelle 1

Aus Tabelle 21 ist zu entnehmen, daß der Hemmstoffnachweis in der Muskulatur nur bei den Kälbern positiv ist, die größere Aureomycinmengen erhalten hatten. Auch diese Hemmungen waren nur in einem Fall mittelgradig, meist nur geringgradig oder angedeutet.

Die Nierenextrakte der mit großen Mengen behandelten Kälber wiesen deutliche, zum Teil absolute Hemmungen auf, während in der Gruppe der mit 80 mg Aureomycin pro Tag behandelten Versuchstiere nur geringgradige, also keine deutliche Hemmung zu beobachten war.

Der mit den pathologisch veränderten Lebern und Milzen dieser Versuchstiere durchgeführte Hemmstoffnachweis ergab infolge der starken Eigenfarbe der aus diesen Organen hergestellten Testbouillon keine verwertbaren Ergebnisse.

D. DISKUSSION

In den vorstehenden Untersuchungen wurden zunächst Grundlagen für einen biologischen Test erarbeitet, mit dem in unspezifischer Weise möglichst viele Hemmstoffe erfaßt werden können. Die Untersuchungen erfolgten zum Teil in Anlehnung an bereits bekannte Verfahren zur Antibiotikatestung (137) und zur Ermittlung von Hemmstoffen in der Milch (95, 96, 70). Ferner wurde das auf den Kluyver-Test (66) zurückgehende Prinzip angewandt, wonach das zu untersuchende Lebensmittel in möglichst wenig veränderter Form als Nährboden dienen soll.

In Vorversuchen wurden zunächst optimale Bedingungen für die Durchführung des Testes ermittelt. So erwiesen sich von den getesteten Keimen Staphylokokken am geeignetsten, da sie die erforderlichen Eigenschaften am ehesten besitzen. Sie vermehren sich rasch, sind hinsichtlich des Nährmilieus relativ anspruchslos und weisen vor allem eine große Empfindlichkeit gegenüber verschiedenartigen Hemmstoffen auf. Die starke und rasche Reduktion von Redoxindikatoren erleichtert die Beurteilung des Wachstums dieser Keime im flüssigen Nährmilieu, so daß Wachstum und Hemmungen ohne größeren Aufwand deutlich gemacht werden.

Es wäre vorteilhaft, wenn man für biologische Teste die Keime in möglichst standardisierter Form zugeben könnte. Diese Möglichkeit ist entweder durch die Gefriertrocknung von Testkeimen gegeben oder durch die Verwendung solcher Keime, die Dauerformen (Sporen) bilden. Die Gefriertrocknung konnte aus technischen Gründen nicht eingesetzt werden, außerdem scheinen lyophilisierte Keime nicht die nötige Aktivität zu besitzen, um für Schnellteste verwendet werden zu können. Sporenaufschwemmungen scheinen im allgemeinen das Mittel der Wahl zu sein, zumal kühl aufbewahrte Sporensuspensionen ständig vorrätig gehalten und auch heißen Nährböden zugesetzt werden können. Für Schnellteste erwiesen sich Sporenbildner in orientierenden Versuchen als unbrauchbar, da der Zeitraum zwischen Beimpfung und frühestmöglicher Ablesung zu groß war. Offenbar erfordern Auskeimung und Aktivierung der Stoffwechselvorgänge doch erhebliche Zeit.

Die verwendete Staphylokokkenkultur (ATCC 6538 - P) wurde nach etwa 18stündiger Bebrütung verwendet. Günstigste Ergebnisse wurden mit Kulturen erzielt, die zwei Bouillonpassagen hinter sich hatten. Die Empfindlichkeit des Testes konnte durch entsprechende Verdünnung der Ausgangskultur erheblich gesteigert werden. So ergab sich eine optimale Verdünnung, wenn

der Ansatz 5 % Ausgangskultur enthielt (0,5 ml Testkultur auf 9,5 ml Bouillon bzw. fraglichen Extrakt). Streptomycin hemmte sogar erst bei 200facher Verdünnung (0,5 % Ausgangskultur). Lediglich Borsäure schien bei stärkerer Keimdichte (10 % Testkultur) deutlicher zu hemmen. Als kürzestmögliche Bebrütungszeit wurden 3 Stunden ermittelt, wozu noch 30 min für die Reduktion des Formazans kommen.

Große Bedeutung kommt dem p_H-Wert bei der Durchführung biologischer Hemmstoffteste zu. Infolge unterschiedlicher Wirkungsoptima der verschiedenen Hemmstoffe ist die Vornahme eines einheitlichen Testes nicht möglich. So haben nach KLEIN (64) Streptomycin das Wirkungsoptimum bei p_H 7,8, Penicillin bei p_H 6,5, Tetracycline bei p_H 6,1. Sorbinsäure und Benzoesäure sind überhaupt erst bei solchen p_H-Werten wirksam, bei denen sie in möglichst undissoziierter Form vorliegen; das ist bei p_H-Werten unterhalb von 5,5 der Fall.

Daraus erhellt, daß einerseits Testkeime verwendet werden sollen, die in einem möglichst weiten p_H-Bereich gut wachsen und daß andererseits Ansätze mit verschiedenen p_H-Werten erforderlich sind. Staphylokokken erfüllen auch diese Bedingung; sie wachsen in einem p_H-Bereich von 3,9 - 8,9 mit einem Optimum bei 6,4 (36).

Schwierigkeiten gibt es dagegen mit dem gewählten Redoxindikator, da TTC erst bei p_H-Werten über 7 optimal zu Formazan reduziert wird; allerdings ist bei gutem Keimwachstum auch zwischen p_H 6 und 7 noch ausreichende Farbintensität möglich, so daß jeweils ein Ansatz auf 6,5 eingestellt wurde, um die wichtigsten Antibiotika, wie Tetracycline und Penicillin, gut zu erfassen. Die Ansätze bei p_H 8,0 galten vor allem der Erfassung von Streptomycin. Der Nachweis von Konservierungsmitteln, die oberhalb von p_H 5,5 kaum eine nennenswerte Wirkung haben, kann mit diesem Test in der beschriebenen Weise nicht erfolgen, es wäre jedoch daran zu denken, das p_H nach der Bebrütung auf einen für die Formazanbildung günstigen Punkt zu erhöhen, denn vom Wachstum der Keime betrachtet kann der eigentliche Test auch bei p_H 5 durchgeführt werden.

Tabelle 22

Vergleich der Empfindlichkeit verschiedener biologischer Hemmstoffteste

		Borsäure in %	Hexamethylentetramin in %	Benzoesäure in %	Penicillin in E/ml	Chlortetracyclin in µg/ml	Streptomycin in µg/ml
Kluyver-Test	Mossel (88)	0,02	0,1	0,01-0,1	-	-	-
	Coretti (13)	0,1-0,2	0,02-0,04	0,025-0,05	-	-	-
Reduktometrischer Test nach Eisenbrand u. a. (21)		0,05-0,1	0,15-0,2	0,25	0,1-0,2	-	-
Diffusionstest zum Antibiotikanachweis	in Serum unter Verwendung von Bac. subtilis bzw. Bac. cereus (Klein (64))	-	-	0,02	0,002	-	0,5-1,0
	in Fleisch- und Organproben (Kelch u. Coretti (57)) unter Verwendung von Bac. cereus sowie Kissling (62)	-	-	-	-	0,1	-
TTC-Test unter Verwendung von	Str. thermophilus in Milch nach Angaben von Neal und Galbert (95, 96)	-	-	-	0,04	0,2	4,0
	Staphylococcus aureus ATCC Nr. 6538-P) in Bouillon	0,01	0,01	0,006	0,004	0,002	0,04

Die Empfindlichkeit der gefundenen Methode wurde auch mit anderen Testen verglichen (Tab. 22). Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, daß die eigenen Werte bei Lösung von Hemmstoffen in optimalen Nährböden ermittelt werden und nicht auf Hemmstoffkonzentrationen in Lebensmitteln projiziert werden können, zumal durch das Lebensmittel oder Lebensmittelzusatzstoffe Eigenhemmung bedingt werden kann.

Erfahrungsgemäß sind die Schwellenwerte bei Lebensmitteln erheblich höher. Allerdings sind auch die bisherigen in der Tabelle verglichenen Teste zum Teil mit reinen Hemmstofflösungen vorgenommen worden.

Für die praktische Anwendung des TTC-Testes bei Lebensmitteln tierischer Herkunft konnten folgende Erfahrungen gewonnen werden:
Zunächst ist zur besseren Extraktion die Zerkleinerung des Untersuchungsmaterials erforderlich, dem einige das Keimwachstum fördernde Stoffe beigefügt werden müssen. Bei rohem Material ist Erhitzung erforderlich, um originäre Reduktasen und vorhandene Keime abzutöten. In dem Versuch an in Chlortetracyclin (CTC) getauchtem Rindfleisch ergab sich, daß die Aktivität des Antibiotikums trotz Erhitzung weitgehend erhalten bleibt. Dies steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen anderer Autoren (29) (110) an Chlor- und Oxytetracyclin. Im Laufe der 120stündigen Lagerung war jedoch eine merkliche Abnahme der CTC-Aktivität festzustellen.

Die weiteren Untersuchungen an Schlachttieren, die vorher nutritive und therapeutische Antibiotikamengen erhalten hatten, zeigten, daß die bei der Fütterung üblichen Mengen im Gewebe keine so hohen Spiegel erzeugten, daß sie mit dem Test nachzuweisen waren. Dies ergaben sowohl die Untersuchungen bei 15 Schweinen als auch bei 7 Kälbern, womit die Untersuchungen von BRÜGGEMANN und MERKENSCHLAGER (9) nochmals bestätigt sind.

Für eine eventuelle Anwendung dieses Testes bei Fleisch und anderen Lebensmitteln oder bei Organen, die zur bakteriologischen Fleischuntersuchung eingesandt wurden, bedeutet es, daß der positive Ausfall der Methode nicht auf Antibiotika zurückgeführt werden kann, die aus Futtermischungen stammen, sondern daß entweder eine Behandlung des Tieres stattgefunden haben muß oder daß ein Zusatz von Hemmstoffen zur Konservierung vorgenommen wurde.

Der Antibiotikanachweis bei einem mit 500 000 E Penicillin behandelten Schwein und bei 2 mit 1000 mg CTC behandelten Kälbern gelang am besten aus Nierenextrakten. Die Leber enthält zwar im allgemeinen mehr CTC,

jedoch störte die Eigenfarbe des Extraktes, ebenso bei der Milz, die Ablesung. In der Muskulatur wurden nur selten Hemmungen festgestellt, so daß positive Ergebnisse in Muskeln nur mit geringer Wahrscheinlichkeit auf Antibiotikabehandlungen zurückgeführt werden können, zumal nach einer mehrtägigen Lagerung auch geringfügige Hemmungen nicht mehr feststellbar waren. Wenn also Muskelextrakte hemmstoffpositiv sind, liegt die Wahrscheinlichkeit einer konservierenden Behandlung sehr nahe.

Nach diesen Untersuchungen ist der Test geeignet, zur Ermittlung von konserviertem Fleisch und von hemmstoffhaltigen Organen, die zur bakteriologischen Untersuchung eingesandt werden. Dazu wird folgende Methode vorgeschlagen:
1 Teil des zerkleinerten Untersuchungsmaterials wird mit 2 Teilen Peptonwasser (1 % Pepton, 1 % Dextrose, 0,5 %NaCl) vermischt und eine Stunde im Kühlschrank extrahiert. Bei rohem Untersuchungsmaterial ist die Erhitzung dieses Gemisches (80 ^{o} C bis zu 5 min) erforderlich, um originäre Fermente auszuschalten. Die Extraktion kann dann unterbleiben. Der Extrakt wird filtriert (eventuell auch zentrifugiert), teils auf p_H 6,5, teils auf p_H 8 eingestellt und dann jeweils 9,5 ml mit 0,5 ml Staphylokokkenkultur (ATCC 6538-P) beimpft und vermischt. Die Kultur soll, bevor sie verwendet wird, mindestens zwei Bouillonpassagen hinter sich haben. Nach 3stündiger Bebrütung bei 37 ^{o} C werden 0,5 ml einer 2 %igen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloridlösung (TTC) zugegeben, gut gemischt und für weitere 30 min bebrütet. Die Bebrütung im Wasserbad ist vorzuziehen, zumindest sollten kühle Proben vor der Bebrütung im Brutschrank in warmem Wasser vorgewärmt werden.

An Kontrollen sind erforderlich: unbeimpfter Extrakt mit TTC versetzt und 30 min bebrütet (Extraktkontrolle); x) kurz vor dem Zusatz beimpfter aber unbebrüteter und mit TTC versetzter Extrakt, der die Farbbildung der Ausgangskultur anzeigen soll (Blindwert); hemmstoffreies Nährsubstrat, das wie der fragliche Extrakt behandelt wurde (Kulturkontrolle).

Der Test spricht auf Konservierungsmittel, die ihr Optimum bei p_H 5 haben, nicht sehr gut an und bedarf hier noch der Modifikation. Eine Untersuchung auf derartige Hemmstoffe ist allerdings auch nur bei solchen Lebensmitteln interessant, die ebenfalls niedrige p_H-Werte aufweisen.

Bei Extrakten mit Eigenfarbe, insbesondere mit rötlichen Farbtönen, ist die Durchführung ebenfalls nicht erfolgversprechend.

---

x) beimpfter und bebrüteter Extrakt ohne TTC (Eigenfarbekontrolle)

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Für einen biologischen Schnelltest zum Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln tierischer Herkunft wurden Grundlagen erarbeitet. Sein Prinzip beruht darauf, daß Extrakte aus Lebensmitteln mit Staphylokokken beimpft und bebrütet werden, und danach das Wachstum der Keime durch Zusatz von 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid deutlich gemacht wird, da dieses je nach Wachstumsintensität zu rotem Formazan reduziert wird.

2. In Vorversuchen wurde die Empfindlichkeit der Methode an Lösungen verschiedener Hemmstoffe in Bouillon geprüft (Penicillin, Chlortetracyclin, Streptomycin, Sorbinsäure, Benzoesäure, Hexamethylentetramin, Borsäure und eine Ampholytseife).

3. Die praktische Anwendung erfolgte an in Chlortetracyclin getauchtem Rindfleisch, an Fleisch und Organen eines Schweines, dem 22 Stunden vor der Schlachtung 500 000 E Penicillin verabreicht worden waren, an Organen von 15 mit nutritiven Chlortetracyclinmengen gefütterten Schweinen und an den Organen von 13 Kälbern, denen Chlortetracyclin teils in nutritiv, teils in therapeutisch wirksamer Dosierung verabreicht worden war.

4. Der Test ist gut geeignet zur Ermittlung von konserviertem Fleisch und von Hemmstoffen in Organen, die zur bakteriologischen Fleischuntersuchung eingesandt werden. Antibiotika sind nur nach therapeutischer Verabreichung und dann meist nur in Organen nachzuweisen, während nutritiv wirksame Mengen überhaupt nicht nachgewiesen werden können. Sofern der Test bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung verwendet werden soll, kann man sich auf die Untersuchung der Niere beschränken.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbey, A., M. A. Darken, E. F. Kline, A. R. Kohler, V. P. Maturi, W. H. Miller und S. D. Upham: Comprehensive studies of the use of a food grade of chlortetracycline in poultry processing. III. Evaluation of raw and cooked poultry by microbiologic chlortetracycline assay. Antibiotics Annual 1956-57, 831;

2. Bajusz, E.: Fragen der biologischen Anwendungsmöglichkeit von 2, 3, 5 - Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) im Spiegel der neuesten chemischen Forschung. Laboratoriumsbl. Serumvertrieb Marburg/Lahn 5 (1955), 44;

3. Becker, H., und G. Quadbeck: Vitalversuche am Zentralnervensystem mit Triphenyltetrazoliumchlorid. Naturwissenschaften 37 (1950), 565;

4. Becker, E., und J. Roeder: Sorbinsäure als Konservierungsmittel für Margarine. Fette-Seifen-Anstrichmittel 59 (1957), 321;

5. Behre, A.: Hexamethylentetramin als Konservierungsmittel für Kaltmarinaden. Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 53 (1957), 81;

6. Bielig, H. J., G. A. Kausche und H. Haardick: Über den Zusammenhang von TTC-Reduktionsorten und sogenannten Nukleoiden bei Bakterien. Naturwissenschaften 39 (1952), 354;

7. Brandes, H.: Werden Schimmelpilze in ihrem Wachstum durch Aureomycin gefördert? Arch. Lebensmittelhyg. 9 (1958), 56;

8. Brauss, W.: Elektronenoptische Beobachtungen an Colibakterien. Zbl. Bakt. I 158 (1952), 338;

9. Brüggemann, J., und M. Merkenschlager: Verbleib von Antibiotika im Tierkörper nach Fütterung und Schlachtung. Arch. Lebensmittelhyg., 9 (1958), 197;

10. Brüggemann, J. und M. Merkenschlager: Die Umstellung der Magen-Darmflora im Anschluß an die Zufütterung von Antibiotika an Wiederkäuer. Futter und Fütterung 8 (1957), 33;

11. Carlson, Sv., und H. M. Bauer: Nisin, ein antibakterieller Wirkstoff aus Streptococcus lactis unter Berücksichtigung des Resistenzproblems. Arch. Hyg. 141 (1957), 445;

12. Clarenburg, A., und E. H. Kampelmacher: Die Bedeutung von Antibiotika für die bakteriologische Fleischbeschau mit besonderer Berücksichtigung der Milzbrand- und Salmonella-Diagnostik. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 70, (1957), 203;

13. Coretti, K.: Versuche über eine mikrobiologische Methode zum Nachweis von Konservierungsmitteln in Fleischwaren. Jahresbericht Bundesforschungsanst. f. Fleischwirtsch. 1955;

14. Costilow, R. N., W. E. Ferguson und S. Ray: Sorbic acid as a solutive agent in cucumber fermentations. I. Effect of sorbic acid on microorganisms associated with cucumber fermentations. Applied Microbiology 3 (1955), 341;

15. Cremer, H. D.: Die physiologische Bedeutung der chemischen Behandlung von Nahrungsmitteln. Lebensmitt. Untersuch. 96 (1953), 188;

16. Danopoulos, E., B. Angelopoulos, G. Kottakis, und Chr. Zioudrou: Experimentelle Versuche über die Resorption von Aureomycin durch Magen und Dünndarm und über dessen Ausscheidung durch die Galle. Schweiz. Med. Wschr. 84 (1954), 1064;

17. Deatherage, F.E.: Use of antibiotics in the preservation of meats and other food products. Am. Journ. Publ. Health 47 (1957), 594;

18. Dias, V.M. und N.P.M. Silva: Unterscheidung zwischen Listeria monocytogenes und Erysipelothrix rhusiopathiae mittels des Triphenyltetrazoliumchlorids. Zbl. Bakt. I, 171 (1958), 317;

19. Dragon, G.: Ein Beitrag zur Ermittlung von Hemmstoffen in der Trinkmilch mittels Tetrasoliumsalz als Indikator und die Möglichkeit ihrer weiteren Differenzierung mit Hilfe des Kluyver-Gärungstestes. Milchwissenschaft 13 (1958), 304;

20. Eichholtz, F.: Lehrbuch der Pharmakologie. 3. u. 4. Aufl. Berlin: Springer-Verlag 1944;

21. Eisenbrand, J., A. Klauck und D. Pfeil: Azofarbstoffe als Indikatoren für den Nachweis von Konservierungsmitteln und verwandten Stoffen im mikrobiologischen Ansatz. Naturwissenschaften 43 (1956), 519;

22. Eyer, H., und H.W. v. Schrader-Beielstein: Über ein das Bakterienwachstum förderndes Prinzip. II. Mitteilung Zbl. Bakt. I 169 (1957), 108;

23. Eyer, H., G. Linzenmeier, und H.W. v. Schrader-Beielstein: Über ein das Bakterienwachstum förderndes Prinzip III. Mitteilung Zbl. Bakt. I. 169 (1957), 205;

24. Fleischmann, K.: Läßt sich Penicillin in der Milch nachweisen? Dtsch. Molkerei-Ztg. 75 (1954), 534

25. Foster, E.M., F.E. Nelson, M.L. Speck, R.N. Doetsch und J.C. Olson: Dairy Microbiology. Macmillan & Co Ltd. London 1958 p. 75, 152;

26. Fussgänger, R.: Zur Frage der Penicillinresistenz der Rotlaufbakterien. Vet. Med. Nachr. 1958, Nr. 1, 23;

27. Gerriets, E.: Experimentelle Therapieversuche bei der S. pullorum-Infektion der Küken mit Aureomycin ad us. vet. Arch. f. Geflügelkunde 21 (1957), 118;

28. Gillissen G., und E. Becher: Die Reduktion von 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) als Methode zur antibakteriellen Wertigkeitsbestimmung. Arch. Hyg. 141 (1957), 403;

29. Goldstein, S. W., D. C. Grove, W. W. Wright, A. Kirshbaum und H. R. Hernandez: A comparative study of the biological and chemikal assays of aureomycin treated under certain conditions. J. of the Am. Pharmac. Assoc. 40 (1951), 453;

30. Gratzl, E., und W. Jaksch: Terramycin-Blutspiegel bei Pferd, Rind und Hund. Wien. Tierärztl. Moschr. 40 (1953), 643;

31. Gratzl, E., und W. Jaksch: Aureomycinblutspiegel-Bestimmungen bei Pferd, Rind und Hund. Wien. Tierärztl. Moschr. 41 (1954), 73;

32. Gratzl, E., und W. Jaksch: Der Penicillinblutspiegel bei Pferd, Rind und Hund. Wien. Tierärztl. Moschr. 39 (1952), 144 u. 225;

33. Gratzl, E. und R. Szumlakowski: Streptomycin-Blutserumspiegelbestimmungen bei Pferd, Rind und Hund, sowie zwei Verfahren zur Spiegelverlängerung. - Wien. Tierärztl. Moschr. 40 (1953), 547;

34. Grau, R., und K. Coretti: Versuche mit dem Konservierungsmittel Hydrin. Fleischwirtschaft 5 (1953), 305;

35. Grau, R.: Untersuchungen mit Aureomycin in der Fleischkonservierung. Intern. Sympos. Wien 1956, Editio Cantor, Aulendorf/Wttbg. 1957;

36. Hallmann, L.: Bakteriologische Nährböden. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1953;

37. Hayek, v. H.: Zur Darstellung von Reduktionsorten mittels Tetrazol beim Meerschweinchen. Naturwissenschaften 37 (1950), 262;

38. Henneberg, G., und W. Waterstraat: Methoden der quantitativen Streptomycin- und Aureomycinbestimmung. Zbl. Bakt. I 156 (1950/51), 258;

39. Henneberg, O. H., und A. Habelt: Versuche über die Verlängerung der Haltbarkeit von Rindfleisch mit Tetracyclin. Wien. Tierärztl. Moschr. 45 (1958), 473;

40. Herter, R.: Zur Ausführung und Auswertung der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Lebensmitteltierarzt 4 (1953), 245;

41. Hock, A.: Einfluß der Antibiotika auf das Wachstum - Sammelreferat. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 66 (1959), 48 u. 102;

42. Hörnicke, H., und W. Wagner: Untersuchungen über den Einfluß eiweißarmer Ernährung auf den Wasser- und Fettgehalt im Schweinekörper und dessen Beeinflussung durch Antibiotika. DTW 65 (1958), 605;

43. Hunter, G. J. E.: A note on the effect of penicillin in the reductase test for milk quality. J. Dairy Res. 16 (1949), 149;

44. Hutschenreuther, R.: Beiträge zur Methodik der Konservierungsmittelbestimmung in fischindustriellen Erzeugnissen. Z. Lebensmitt. -Untersuch. 104 (1956), 161;

45. Institut für Fischverarbeitung, Hamburg: Formaldehyd-Gehalt in geräucherten Lebensmitteln. Arch. Lebensmittelhyg. 10 (1959), 22;

46. Jacksch, W.: Blutspiegelbestimmungen nach 1-Ephenamin-Penicillin-Gaben bei Pferd, Rind und Hund. Monh. Tierhlkd. 6 (1954), 11;

47. Jahn, W., und H. Jüngst: Omnacillin-Omnamycin. Wissenschaftliche Beiträge für die Tierärztliche Praxis. Elwert Universitäts- u. Verl. Buchh. Marburg/Lahn 1954;

48. Janiczek, J.: Untersuchung über die Verlängerung der Frischerhaltung geschlachteter Hühner unter Verwendung von Penicillin und Tetracyclin. Vet. Med. Diss. Wien 1957;

49. Janke, A., R. G. Janke, K. Bauer, H. Heilmann, H. Kirchmeyer und W. G. Kostjak: Über die Erhöhung der Haltbarkeit geschlachteter Hühner durch Behandlung mit Chlortetracyclin. Zbl. Bakt. Abt. II 111 (1958), 291;

50. Jay, J. M., H. H. Weiser und F. E. Deatherage: The effect of chlortetracycline on the microflora of beef, and studies on the mode of action of this antibiotic in meat preservation. Antibiotics Annual 1956-57, 954;

51. Jay, J. M., H. H. Weiser und F. E. Deatherage: Further studies on the preservation of beef with chlortetracycline. Food Technol. 11 (1957), 563;

52. Jerchel, D., und W. Möhle: Die Bestimmung des Reduktionspotentials von Tetrazoliumsalzen. Bericht Dtsch. Chem. Ges. 77 (1944), 591;

53. Johns, L. K.: Substances in herd milks inhibiting acid production. Can. J. Agr. Sci. 33 (1953), 586;

54. Johns, L.K. und G. Desmarais: The effect of residual penicillin in milk on the dye reduction tests for quality. Can. J.Agr. Sci. 33 (1953), 91;

55. Kämmerer, K.: Ist Penicillin in der Fütterung ein Probiotikum oder ein Antibiotikum? Vet. Med. Nachr. 1958, Nr. 4, 231;

56. Kalich, J., und M. Merkenschlager: Zur Frage des Salmonellanachweises in Organen nach Antibiotika-Therapie bzw. Beifütterung. Tierärztl. Umschau 13 (1958), 324;

57. Kelch, F., und K. Coretti: Zum Nachweis von Aureomycin in Fleisch- und Organproben von Schlachttieren. Fleischwirtschaft 11 (1959), 358;

58. Kelch, F.: Neue Erkenntnisse und Probleme der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Fleischwirtschaft 11 (1959), 354;

59. Kiesewalter, J.: Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) in der Medizin. Pharmazie 7 (1952), 580;

60. Killian, H.: Depot-Penicillin, Penicillin-Blutspiegel, Gesetze der Penicillin-Verteilung und Penicillin-Bilanz. Arzneimittelforschung 1 (1951), 107;

61. Kissling, R.: Ein Beitrag zur Verlängerung der Haltbarkeit von Schweinefleisch durch Antibiotika. Vet. Med. Diss. Wien 1957;

62. Kissling, R.: Über den biologischen Nachweis von Antibiotika aus Geweben. Wien. Tierärztl. Moschr. 46 (1959), 466;

63. Klein, H.: Zum Nachweis des coliformen Keimgehaltes in Milchproben. Arch. Lebensmittelhyg. 7 (1956), 86;

64. Klein, P.: Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1957;

65. Kline, E.F., A. Abbey, M.A. Darken, M.C. Firman, A.R. Kohler, W.H. Miller, W.W. Wiley, H. Windlan und S.D. Upham: Improved quality of fish filets as a result of a food grade of chlortetracycline. Antibiotics Annual 1956-57, 997;

66. Kluyver, A.J.: Biochemische Suikerbepalingen. Diss. Univ. Delft 1914, 129; zit. nach Mossel (87);

67. Körnlein, M., A. Lembke und H. Möller: Beiträge zur Methodik biologischer Testverfahren, insbes. Auxanogramm- und Röhrchentest. III. Besondere Einflüsse auf biologische Testverfahren. Zbl. Bakt. I 159 (1952/53), 146;

68. Kohler, A.R., A. Abbey, M.A. Darken, M.C. Firman, E.F. Kline, V.F. Maturi, W.H. Miller und S.D. Upham: Comprehensive studies of the use of a food grade of chlortetracycline in poultry processing. II. Relation of microbial counts to freshness. Antibiotics Annual 1956-57, 822;

69. Kosikowsky, F.V., R.W. Henningson und G.J. Silvermann: The incidence of antibiotics, sulfa drugs and quaternary ammonium compounds in the fluid milk supply of New-York State. J. Dairy Sci. 35 (1952), 533;

69a. Kotter, L.: Einschaltung eines biologischen Hemmstofftestes bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Fleischwirtschaft 12 (1960), 188;

69b. Kotter, L.: Mißbräuchliche Anwendung von Hemmstoffen in Milch und Fleisch. Arch. Lebensmittelhyg. 12 (1961), 100;

70. Kotter, L., und H. Muspach: Zur Beurteilung des Keimgehaltes von Trockenmilch, Magermilch und Milcheiweißpräparaten. Milchwissenschaft 13 (1958), 122;

71. Kotter, L., G. Terplan und G. Pfeiffer: Einfluß von Desinfektionsmittelresten auf die Beurteilung der Milch. Arch. Lebensmittelhyg. (im Druck);

71a. Kotter, L., G. Terplan und H. Schulz: Biologischer Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln tierischer Herkunft. Arch. Lebensmittelhyg. 10 (1959), 145;

72. Kuhn, R., und D. Jerchel: Über Invertseifen, VIII. Mittlg. Reduktion von Tetrazoliumsalzen durch Bakterien, gärende Hefe und keimende Samen. Ber. Dtsch. chem. Ges. 74 (1941), 941;

73. Lang, K.: Zum Problem der Konservierung von Lebensmitteln. Intern. Sympos. Wien 1956 Editio Cantor, Aulendorf/Wttbg. 1957;

74. Leber, H.: A resazurin starter activity test. Milk Plant Monthly 39 (1950), 40; zit. nach Foster und Mitarbeiter (25);

75. Lerche, M., und H. Linke: Versuche zur Abtötung von Salmonellen in flüssigem Eigelb mittels Sorbinsäure. Arch. Lebensmittelhyg. 9 (1958), 121;

76. Lerke, P. A., und L. Farber: Prolongation of the keeping quality of fish and shelfish by antibiotics. Antibiotic Annual 1956-57, 966;

77. Lienhop, E.: Nachweis einer Lebensmittelvergiftung durch Bact. proteus unter Verwendung von TTC-Agar. Lebensmitteltierarzt 5 (1954), 115;

78. Lienert, E., und F. Zöchmann: Penicillin-Serumspiegelbestimmungen beim Hund nach parenteraler Applikation von Natrium bicarbonicum und wässeriger Penicillinlösung bzw. schwerlöslichen Penicillinverbindungen. Wien. Tierärztl. Moschr. 40 (1953), 598;

79. Lochmann, E.H.: Kann das Ergebnis der bakt. Fleischuntersuchung durch z. Zt. des Todes im Organismus befindliches Penicillin beeinflußt werden? Arch. Lebensmittelhyg. 6 (1955), 251;

80. Lorenz, W.: Die Verfütterung von Aurofac vom Standpunkt der Lebensmittelkontrolle. Intern. Sympos. Wien 1956, Editio Cantor, Aulendorf/Wttbg. 1957;

81. Lück, H., und A. Barthelmess: Lebensmittelzusatzstoffe und mutagene Wirkung. Z. Lebensmitt.-Untersuch. 108 (1958), 174;

82. Maier, K.: Aureomycinspiegel in Blut, Harn und Milch beim Schwein. Vet. Med. Diss. Wien 1954;

83. Mannweiler, E.: Wirkungsbedingungen des Tetracyclin bei Salmonellen. Zbl. Bakt. I. 170 (1957), 151;

84. Marquardt, P.: Fremdstoffe in Lebensmitteln und ihre möglichen Gefahren. Münch. Med. Wschr. 100 (1958), 579; 636;

85. Moldavan, A.: Recherche de la présence des antibiotiques dans le lait. Le Lait 31 (1951), 607; zit. nach Mossel (89);

86. Mossel, D.A.A.: Aufgaben und Durchführung der modernen hygienisch bakteriologischen Lebensmittelüberwachung. Wien. Tierärztl. Moschr. 43 (1956), 596;

87. Mossel, D.A.A.: Die Haltbarmachung von Lebensmitteln auf chemischem Wege mit besonderer Berücksichtigung toxikologischer Fragen. Z. Lebensmitt.-Untersuch. 102 (1955), 254;

88. Mossel, D.A.A.: The aspecific detection of preservatives in foods by a simple fermentation test with special reference to cured meat products. Analyst 79 (1954), 443;

89. Mossel, D. A. A.: The Kluyver fermentation test for detecting preservations in foods. Food Manufacture 31 (1956), 190;

90. Mossel, D. A. A.: Methodes microbiologiques de détection des antiseptiques nonpermis dans les matières alimentaires. Rev. Ferm. Ind. Aliment. 9 (1954), 147;

91. Mossel, D. A. A., J. G. Mandersloot, und A. S. S. Gentis: A simplified microbiological test for the detection of preservatives in milk and milk products. Neth. Milk. Dairy J. 9 (1955), 63;

92. Mossel, D. A. A.: Probleme einer wissenschaftlich begründeten bakt. Untersuchung von Fleischwaren mit Hinweis auf deren Lösung. Bericht auf der 2. Arbeitstagung Europ. Fleischforscher, August 1956, Kulmbach;

93. Mossel, D. A. A., und J. G. Mandersloot: The detection of preservatives in milk by a direct lactose fermentation test with special reference to bromacetic acid derivatives. Neth. Milk Dairy J. 7 (1953), 219; Ref. Zschr. Lebensmitt.-Untersuch. 100 (1955), 170;

94. Mulli, K., K. Uhlenbrook, und L. Ludwig: Zum Wirkungsmechanismus des Aureomycin. Arzneimittelforschg. 3 (1953), 559

95. Neal, C. E., und H. E. Calbert: Detection of lactic starter inhibitors using 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride. Milk Products J. 47 (1956), 14;

96. Neal, D. E. und H. E. Calbert: The use of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a test for antibiotic substances in milk. J. Dairy Sci. 38 (1955), 629;

97. Nikkilä, O. E.: In verdorbenen Heringspräserven vorkommende Bakterienarten und ihr Verhalten gegenüber Salz und Konservierungsmitteln. Fette, Seifen, Anstrichmittel. 57 (1955), 495;

98. Nityananda, K., und E.H. Schmid: Salmonellae resistant to antibiotics. Zschr. Hyg. 140 (1954), 80;

99. Niven, C.F. jr., und W.R. Chesbro: Complementary action of antibiotics and irradiation in the preservation of fresh meats. Antibiotica Annual 1956-57, 855;

100. Nolte, A.: Die Anwendung der Antibiotika, insbesondere des Penicillins in der tierärztlichen Praxis. Tierärztl. Umschau 6 (1951), 435;

101. Poulsson, E.: Lehrbuch der Pharmakologie. 16. Aufl. Leipzig: S. Hirzel 1949;

102. Preuner, R., und J. v. Prittwitz-Gaffron: Über den Nachweis von Reduktionsorten in Bazillen und Bakterien und ihren Zusammenhang mit den sog. Nukleoiden. Naturwissenschaften 39 (1952), 128;

103. Roederer, H.: Bactericide und wachstumshemmende Eigenschaften der verschiedenen Zucker gegenüber typischen Wundinfektions- und Eitererregern. Zbl. Bakt. I. 157 (1951/52), 512;

104. Römpp, H.: Chemie Lexikon. 3. Aufl. Frank'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart 1953;

105. Rowlands, A.: The effect of penicillin and the methylene blue reduction time and keeping quality of milk. Proc. Soc. Appl. Bact. 14 (1951), 7;

106. Rudolph, W.: Versuche mit Penicillin-Mycel in der Hähnchenmast. Arch. Geflügelkde. 21 (1957), 369;

107. Sabalitschka, Th.: Beziehungen physikalischer Eigenschaften chemischer Stoffe zu ihrer Wirkung auf Mikroorganismen. Arch. Pharm. 267 (1929), 288;

108. Sabalitschka, Th., und H. Marx: Irrtümer über antimikrobe Wirkungen, insbes. über Konservierungsvermögen von Natriumbenzoat. Pharm. Ztg. 83 (1947), 187;

109. Sacchi, E.M., J.R. McMahan, R.C. Ittke, und C.L. Wrenshall: New methods of preslaughter administration of antibiotics. Bericht auf 17th ann. Meeting Institute of food technologists May 12-16, 1957, Pittsbourgh, Penns.;

110. Shahani, K.M.: Factors affecting Terramycin activity in milk, broth, buffer, and water. J. Dairy Sci. 41 (1958), 382;

111. Siegert, R.: Zur Darstellung von Reduktionsorten in Bakterien. Angew. Chemie 61 (1949), 258;

112. Souci, S.W., und E. Mergenthaler: Fremdstoffe in Lebensmitteln. Verl. J.F. Bergmann, München 1958;

113. Souci, S.W.: Die Behandlung von Lebensmitteln mit fremden Zusatzstoffen. Münch. Med. Wschr. 99 (1957), 1569, 1632;

114. Schaaf, A.v.d.: Behandlung der Salmonellose beim erwachsenen Rind. Vet. Med. Nachr. 2 (1954);

115. Schelhorn, M.v.: Untersuchungen über Konservierungsmittel VIII. Wirksamkeit der Borsäure als Konservierungsmittel. Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 48 (1952), 102;

116. Schelhorn, M.v.: Untersuchungen über Konservierungsmittel IX. Hexamethylentetramin als Konservierungsmittel. Dtsch. Lebensmittel Rdsch. 50 (1954), 90;

117. Schelhorn, M.v.: Untersuchungen über die Wirkung von Konservierungsmitteln. Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 45 (1949), 255;

118. Schelhorn, M.V.: Untersuchungen über Konservierungsmittel. IV. Wirksamkeit verschiedener Konservierungsmittel bei unterschiedlichen p_H-Werten. Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 46 (1950), 151;

119. Schelhorn, M.v.: Untersuchungen über Konservierungsmittel. X. Orientierende Versuche über Sorbinsäure als Konservierungsmittel. Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 50 (1954), 267;

120. Schelhorn, M.v.: Stand der Konservierungsmittelforschung. Fette und Seifen 56 (1954), 221

121. Schermer, J.: Untersuchungen über die Verweildauer des Penicillins im Tierkörper bei verschiedenen Lösungsmitteln. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 56 (1949), 250;

122. Schipper, J.A., und W.E. Petersen: Milch-, Blut- und Harnkonzentration von Aureomycin nach Infusion in das Euter und nach intravenöser Anwendung. Vet. Med. 57 (1952), 367;

123. Schmid, D.O.: Untersuchungen zur funktionellen Morphologie und dynamischen Biochemie der Bakterienzelle. Vet. med. Diss. München 1957;

124. Schmidt-Lorenz, W.: Zur Verwendbarkeit von Hexamethylentetramin und Formaldehyd als Konservierungsmittel. Lebensmittel-Untersuch. 108 (1958), 423;

125. Schönberg, F.: Zur Brauchbarkeit der Tetrazoliumsalze für die Reduktaseprobe (indirekte Keimzahlbestimmung) in Milch. Lebensmitteltierarzt 2 (1951), 52;

126. Schönberg, F.: Zum quantitativen Nachweis des Bact. coli (Escherichia coli) in Milch und Wasser mit Hilfe von Triphenyltetrazoliumchlorid-Agar (TTC-Agar). Lebensmitteltierarzt 4 (1953), 137;

127. Schwarz, G., E. Ciblis und W. Lange: Beitrag zur Reduktionsprobe in der Milch. Milchwissenschaft 8 (1953), 261;

128. Stern, J. A., H. L. Liebmann, G. Kudo, J. Chapel, R. A. Olsen, L. L. Farber, und M. Grennan: The potential application of antibiotics in the salmon canning industry. II. Chemical and bacteriological evaluations: Food Technol. 12 (1958), 132;

129. Tarr, H. L. A.: Chemical inhibition of growth of fish spoilage bacteria. J. Fish. Res. Bd. Canada 6 (1944), 257;

129a. Terplan, G.: Biologischer Nachweis von Hemmstoffen in Fleischkonserven. Arch. Lebensmittelhyg. 11 (1960), 37;

130. Thomson, G., und Sv. Carlson: Der Einfluß von Penicillin auf das Wachstum und die 32 P-Aufnahme einer Staphylococcus aureus-Kultur. Zbl. Bakt. I 159 (1952/53), 202;

131. Tschesche, R.: Der Wirkungsmechanismus von Chemotherapeutika und Antibiotika. Zbl. Bakt. I 158 (1952), 217;

132. Ullberg, S.: The action of penicillin in vitro against Erysipelothrix rhusiopathiae. Nord. Vet. Med. 5 (1953), 677;

133. Vogel, H.: Antibiotika in der Haustierfütterung. Verl. Ed. Cantor, Aulendorf/Wttbg. 1957;

134. Vonderbank, H.: Aureomycin und Achromycin. Klinische Wirkung und deren experimentelle Grundlagen. Verl. Ed. Cantor, Aulendorf/Wttbg. 1956;

135. Wallenfels, K.: Über einen neuen Nachweis reduzierender Zucker im Papierchromatogramm und dessen quantitative Auswertung. Naturwissenschaften 37 (1950), 491;

136. Wallhäusser, K.H., und A. Rippel-Baldes: Die Zuverlässigkeit des antibiotischen Testes mit Diffusionsplatten. Naturwissenschaften 37 (1950), 450;

137. Wallhäusser, K.H.: Wertbestimmung von Antibiotika und Desinfektionsmitteln im Schnelltest mit Triphenyltetrazoliumchlorid. Naturwissenschaften 38 (1951), 237;

138. Wallhäusser, K.H.: Vitalfärbung von Bakterien. Wirkungsmechanismus der Antibiotika-Zellteilungsvorgänge (Vitalfärbung). Zbl. Bakt. I 158 (1952), 358;

139. Wallhäusser, K.H. Die Darstellung der Zellteilungsvorgänge und des Wirkungsmechanismus antibiotischer Stoffe an vital gefärbten Bakterien. Arzneimittelforschung 4 (1954), 118;

140. Walter, A., und L. Heilmeyer: Antibiotika-Fibel. Verl. Georg Thieme, Stuttgart 1954;

141. Weiser, H.H., H.S. Goldberg, V.R. Cahill, L.E. Kunkle, und F.E. Deatherage: Observations on fresh meat processed by the infusion of antibiotics. Food Technol. 7 (1953), 495;

142. White-Stevens, R.H.: Vom Animal-Protein-Factor zum Aurofac in der Tierernährung. Intern. Sympos. Wien 1956, Editio Cantor, Aulendorf/Wttbg. 1957;

143. White-Stevens, R. H.: Die Verwendung von Aureomycin (Chlortetracyclin) zur Verlängerung der Haltbarkeit von Geflügel, Fleisch und Fisch. Intern. Sympos. Wien 1956, Editio Cantor, Aulendorf/Wttbg. 1957;

144. Windlan, H., A. Abbey, M. A. Darken, M. C. Firman, E. F. Kline, W. H. Miller, und S. D. Upham: An Investigation of the process using food grade chlortetracycline as applied to turkeys. Antibiotics Annual 1956-57, 849;

145. Winkle, St.: Mikrobiologische und serologische Diagnostik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1955;

146. Wrenshall, C. L.: Advances in food technology made possible through the use of antibiotics. Antibiotic Annual 1956-57, 809;

147. Wundt, W.: Untersuchungen über die Reduktionswirkung von Bakterien auf Triphenyltetrazoliumchlorid. Dtsch. Med. Wschr. 75 (1950), 1471;

148. Wussow, W., J. H. Weniger, und K. Funk: Beitrag zur Verfütterung von Streptomycin- und Penicillinmycel an wachsende Schweine. Arch. Tierernährung, Festschrift Scheunert, Akad. Verl. Berlin 1954;

149. Wyss, O.: Microbial inhibition by food preservatives. In Advances in food research. Bd. I S. 373 New York: Academic press inc. 1948. zit. nach Cremer (15).

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. Kotter für das Überlassen des Themas und für die Anregungen bei der Durchführung der Arbeit herzlich zu danken.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Terplan für Rat und Anregungen bei den Versuchen.

LEBENSLAUF

Ich wurde als Sohn des Kaufmanns Karl Schulz und seiner Ehefrau Martha am 28. September 1914 in Neustrelitz/Mecklbg. geboren. Nach Besuch der Grundschule und des Carolinum (Gymnasium) in Neustrelitz erhielt ich im März 1935 das Reifezeugnis. Anschließend leistete ich die Arbeits- und Wehrdienstpflicht ab.

Ab Wintersemester 1937 begann ich das tierärztliche Studium an der Universität Leipzig und setzte es an der Tierärztlichen Hochschule Hannover und an der Universität Berlin fort.

Mit Kriegsbeginn wurde ich wieder zur Wehrmacht eingezogen und mit einem Infanterie-Regiment eingesetzt. Im November 1939 wurde ich zur Beendigung des Studiums zur Heeres-Veterinär-Akademie versetzt. Nach bestandener tierärztlicher Prüfung an der Universität Berlin im März 1941 wurde mir die Bestallung als Tierarzt mit Wirkung vom 31. März 1940 vom Reichsminister des Innern erteilt.

Anschließend wurde ich als Veterinäroffizier d. Res. beim Feldheer eingesetzt. Im September 1944 geriet ich als Stabsveterinär d. Res. in Kriegsgefangenschaft, aus der ich im Dezember 1949 entlassen wurde.

Nach weiterer Ausbildung am Städt. Schlacht- und Viehhof Nürnberg und der Staatl. Veterinär-Untersuchungsanstalt Nürnberg legte ich im Oktober 1951 die Prüfung für den tierärztlichen Staatsdienst in Bayern ab.

Seit 1950 war ich als Schlachthoftierarzt am Städt. Schlacht- und Viehhof Nürnberg, kurzfristig auch am Städt. Schlacht- und Viehhof Hof angestellt. Im November 1953 wurde ich unter Berufung in das Beamtenverhältnis zum Städt. Veterinärrat bei der Stadt Nürnberg ernannt. Bis September 1960 war ich im Schlacht- und Viehhof und im Veterinäramt der Stadt Nürnberg tätig. Seit Oktober 1960 bin ich Direktor des Städt. Schlacht- und Viehhofes Schweinfurt und Städt. Veterinärrat des Stadtkreises Schweinfurt.